

Der Effekt von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) bei bakteriell
kontaminierten Tibiaschaftfrakturen

Eine experimentelle Studie an einem Rattenmodell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Henkenberens, Christoph
aus Kiel

Gießen 2012

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
Labor für Experimentelle Unfallchirurgie unter der Leitung von
Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. R. Schnettler

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Volker Alt

Gutachter:

Prof. Dr. Eugen Domann

Tag der Disputation:

08.04.2013

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und theoretische Grundlagen.....	1
1.1	Offene Frakturen	1
1.1.1	Klassifikationen von offenen Frakturen.....	1
1.1.2	Ätiologie und Epidemiologie von Tibiafrakturen.....	1
1.1.3	Behandlung offener Tibiaschaftfrakturen.....	3
1.1.4	Komplikationen und Ergebnisse der Behandlung offener Tibiaschaftfrakturen	10
1.2	Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)	14
1.3	Ziele der Arbeit	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Geräte und Software.....	21
2.1.2	Medikamente	21
2.1.3	OP-Materialien.....	22
2.1.4	Basismedien, Zusätze, Chemikalien, Kits	23
2.1.5	Versuchstiere.....	24
2.1.6	Bakterien	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Studiendesign.....	25
2.2.2	Operationstechnik.....	27
2.2.3	Postoperatives Röntgen	31
2.2.4	Beurteilung von Infektion und Knochenheilung	31
2.2.5	Körpergewichtsentwicklung	32
2.2.6	Klinische Begutachtung der Wunde und Frakturstabilität	32
2.2.7	Bildgebung	32
2.2.8	Mikrobiologie	34
2.2.9	Rasterelektronenmikroskopie	36
2.2.10	Biomechanik	36
3	Resultate.....	39
3.1	Ergebnisse der 1. Pilotstudie	39

3.2 Ergebnisse der 2. Pilotstudie	39
3.2.1 klinische Beurteilung.....	40
3.2.2 Röntgendiagnostik.....	40
3.2.3 Mikrobiologische Auswertung	41
3.2.4 Rasterelektronenmikroskopie	42
3.2.5 Zusammenfassung der 2. Pilotstudie	42
3.3 Hauptstudie	43
3.3.1 klinische Beurteilung.....	44
3.3.2 Körpergewichtsentwicklung	45
3.3.3 Röntgen.....	47
3.3.4 Micro-CT.....	47
3.3.5 Mikrobiologie	49
3.3.6 Rasterelektronenmikroskopie	50
3.3.7 Biomechanik.....	51
3.3.8 Zusammenfassung der Hauptstudie.....	52
4 Diskussion.....	54
4.1 Tiermodell.....	55
4.2 Klinische Studien zur Anwendung von rhBMP-2.....	57
4.3 Experimentelle Studien zur Anwendung von rhBMP-2	58
4.4 Ergebnisse im Vergleich zu anderen präklinischen und klinischen Studien	60
4.5 Beeinflussende Faktoren.....	62
4.6 Ausblick	70
5 Zusammenfassung.....	72
6 Summary.....	74
7 Abkürzungsverzeichnis	76
8 Abbildungsverzeichnis	78
9 Tabellenverzeichnis	79
10 Literaturverzeichnis	80
11 Publikationsverzeichnis	108
12 Vortrag	108
13 Preise.....	108

14 Ehrenwörtliche Erklärung	109
15 Danksagung.....	110
16 Lebenslauf Christoph Henkenberens	111

1 Einleitung und theoretische Grundlagen

1.1 Offene Frakturen

1.1.1 Klassifikationen von offenen Frakturen

Neben den einheitlichen Klassifikationen für Frakturen und Weichteilschäden der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (AO) wird im europäischen Raum die Klassifikation nach Tscherny und Oestern und im angloamerikanischen Raum, die in dieser Arbeit verwendete Klassifikation für offene Frakturen nach Gustilo und Anderson bevorzugt (Tab. 1; Gustilo und Anderson, 1976). Die Einteilung in drei Grade entsprechend der klinischen Manifestation korreliert mit der Inzidenz der Komplikationsrate und dem klinischen Outcome (Cole et al., 1995; Crowley et al., 2007; Gustilo und Anderson, 1976; Gustilo et al., 1984).

Grad I	Hautwunde <1cm, nicht verschmutzt, Durchspießung von innen, minimale Muskelkontusion, einfache Quer- oder kurze Schrägfraktur.	
Grad II	Hautwunde >1cm, ausgedehnter Weichteilschaden mit Lappenbildung oder Décollement, mittelgradige Muskelquetschung, einfache Quer- oder kurze Schrägfraktur mit kleiner Trümmerzone.	
Grad III	Ausgedehnter Weichteilschaden mit Zerstörung von Haut, Muskel, neurovaskulären Strukturen, Hochrasanztrauma mit schwerer Gewebequetschung.	IIIA: Ausgedehnter Weichteilschaden mit noch adäquater Knochendeckung, Stück-, und Schussfrakturen.
		IIIB: Ausgedehnter Weichteilschaden mit Deperiostierung und freiliegendem Knochen, massive Kontamination.
		IIIC: Rekonstruktionspflichtige neurovaskuläre Verletzung.

Tabelle 1: Klassifikation offener Frakturen nach Gustilo und Anderson

1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie von Tibiafrakturen

Die Tibiafraktur stellt mit einer Inzidenz von 17-21/100.000 Personen die häufigste Fraktur eines langen Röhrenknochens beim Menschen dar und wird in der Regel durch ein Hochrasanztrauma verursacht. Häufigste Ursache sind Verkehrsunfälle (37,5%)

gefolgt von Sportunfällen (30,9%) und Stürze aus unterschiedlicher Höhe (26,5%), so dass das mittlere Alter der Patienten mit 40,4 Jahren für distale, mit 31,3 Jahren für Schaft und mit 49,8 Jahren für distale Frakturen vergleichbar niedrig ist. Selten sind pathologische Frakturen, auch Spontanfrakturen genannt, die aufgrund einer systemischen oder lokalen Destruktion der Knochensubstanz die Knochenstatik soweit negativ beeinflussen, dass der Knochen ohne adäquates Trauma frakturiert (Court-Brown und Caesar, 2006; Hansen et al., 2002).

Häufigste Frakturlokalisation ist die Diaphyse (41-44%), gefolgt vom distalen (37-48%) und proximalen Drittel (8-22%). Sowohl die auf die Tibia einwirkenden Kräfte eines Hochrasanztraumas, als auch die geringe Weichteildeckung im anteromedialen Bereich führen zu einem Anteil von 23,5% offener Verletzungen bei allen Tibiafrakturen (Cole, 1998; Court-Brown et al., 1998). Die offene Tibiafraktur stellt mit 44,5% (Court-Brown et al., 1998) und die offene Schaftfraktur mit 36,7% die häufigste offene Fraktur eines langen Röhrenknochens dar (Court-Brown und Caesar, 2006).

Circa 64% der offenen Tibiafrakturen sind im Schaftbereich lokalisiert, entsprechend 15% der Gesamtheit von offenen und geschlossenen Tibiafrakturen. Die offenen Tibiafrakturen verteilen sich in ihrer Häufigkeit (Abb. 1) anhand der Gustilo und Anderson Klassifikation wie folgt:

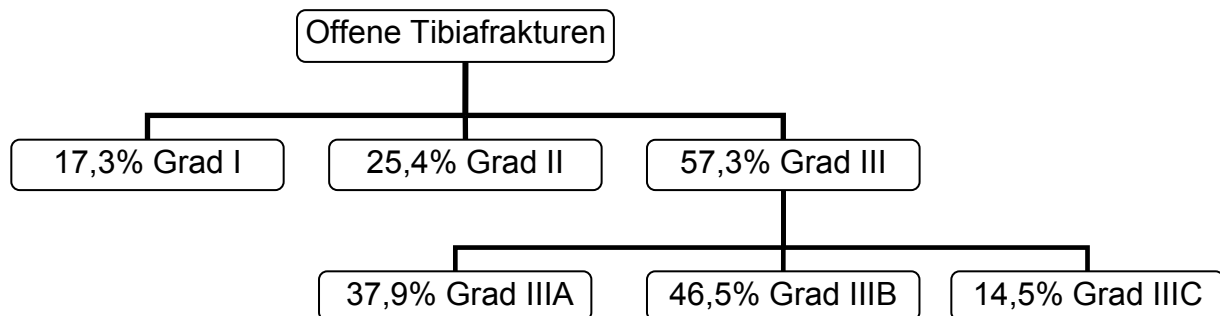


Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung offener Tibiaschaftfrakturen
Modifiziert nach Papakostidis et al., 2011.

Die Häufigkeit drittgradig offener Frakturen verdeutlicht, dass offene Tibiaschaftfrakturen regelmäßig mit ausgedehnten Schäden des Haut- und Weichteilmantels einhergehen. Dies ist insofern von prognostischer Bedeutung, da höhergradige Frakturen mit einer signifikant höheren Komplikationsrate und schlechterem klinischen Behandlungsergebnis assoziiert sind als Frakturen, die als erst- oder zweitgradig klassifiziert werden (Papakostidis et al., 2011).

1.1.3 Behandlung offener Tibiaschaftfrakturen

Die Behandlung offener Tibiafrakturen erfordert komplexe und individuell auf den Patienten abgestimmte Therapiealgorithmen, die einerseits durch den Schweregrad der Verletzung anhand der Gustilo und Anderson Klassifikation und andererseits durch den Allgemeinzustand des Patienten maßgeblich beeinflusst werden.

Die Behandlung umfasst die notfallmedizinische Versorgung des Patienten zur Sicherung und Stabilisierung der Vitalfunktionen, die klinische Untersuchung zur Klassifikation der Fraktur, die operative Versorgung bestehend aus primär-definitiver oder zweizeitiger sekundär-definitiver Osteosynthese, sowie die anschließende Rehabilitation. Eventuell sind weitere rekonstruktive Eingriffe zur Wiederherstellung von knöchernen Strukturen und des Weichteilmantels erforderlich.

Initiale Versorgung

Mehr als die Hälfte der Patienten mit offenen Tibiafrakturen sind polytraumatisiert und werden innerklinisch nach den Leitlinien des Advanced Trauma Life Support (ATLS) versorgt (American College of Surgeons Committee on Trauma, 2008; Court-Brown et al., 2008). Mit Ausnahme von aktiven Blutungen (Chapman und Olson, 1996) schließt sich dann unverzüglich die ausführliche klinische Untersuchung und operative Erstversorgung der frakturierten Tibia im Operationssaal unter sterilen Bedingungen an (Gregory und Sanders, 1995).

Besonderes Augenmerk liegt hier auf dem Ausmaß der Weichteilschäden und dem neurovaskulären Status, um die Fraktur anhand der Kriterien der Gustilo und Anderson Klassifikation zu klassifizieren. Zusätzlich stellt die Anfertigung von Röntgenbildern in zwei Ebenen, inklusive dem angrenzenden Knie- und Sprunggelenk, einen obligaten Bestandteil der Diagnostik dar (Mashru et al., 2005). Bei offensichtlicher grober Fehlstellung oder Dislokation von größeren Knochenfragmenten wird die Tibia initial reponiert um den Druck auf die Weichteile zu reduzieren und weitere neurovaskuläre Schäden zu verhindern (Tscherne, 1984). Die Indikation zur Angiographie ist bei fehlenden peripheren Pulsen und/oder einem Knöchel-Arm-Index von $<0,9$ gegeben (Melvin et al., 2010a). Insbesondere bei Grad IIIC- Frakturen mit obligaten neurovaskulären Verletzungen muss in Abhängigkeit vom Gesamtzustand des Patienten und Ausmaß rekonstruktionspflichtiger Gefäß- und Nervenverletzungen die primäre Amputation zur Reduktion der Letalität („life before limb“) erwogen werden. Dies erklärt Amputationsraten von 16,6% (Soni et al., 2012) bis zu 78% (Flint und Richardson, 1983).

Antibiotikaprophylaxe

Offene Tibiafrakturen sind vulnerabler für Infektionen als offene Frakturen anderer Röhrenknochen und zeigen eine doppelt so hohe Infektionsrate von 10,5% respektive 5,3% (Gustilo et al., 1984). Die prä- und intraoperative Anlage von Bakterienkulturen ist mit einem positiven Vorhersagewert von 8% ebenso wie die unmittelbar postoperative Anlage von Bakterienkulturen, die in 42% zu einem positiven Wachstum mit einem hohen Anteil von 75% falsch-positiven Ergebnissen führt, nicht zu empfehlen (Lee, 1997; Valenziano et al., 2002).

Auf Grund des hohen Infektionsrisikos von offenen Tibiafrakturen wird so früh wie möglich mit einer systemischen Antibiotikaprophylaxe begonnen (Patzakis und Wilkins, 1989). Über die Dauer der Antibiotikagabe herrscht ebenso Uneinigkeit wie über die Auswahl des Antibiotikums. Gesichert scheint, dass eine spezifische Prophylaxe gegen gramnegative Bakterien die Infektionsrate nicht senkt. Für erstgradig offene Frakturen scheint die Gabe eines Cephalosporins der ersten Generation (z.B. Cefazolin) ausreichend zu sein (Hauser et al., 2006). Alternativ kann ein Fluorchinolon (z.B. Ciprofloxacin) eingesetzt werden (Patzakis et al., 2000), welches unter Umständen negativen Einfluss auf die Knochenheilung ausübt (Huddleston et al., 2000). Zur Zeit wird in der Regel für zweit- und drittgradig offene Frakturen eine Kombinationsantibiose aus mindestens zwei verschiedenen Substanzen, bestehend aus einem Cephalosporin der zweiten Generation und einem Aminoglykosid, empfohlen um das typische Erregerspektrum von Knocheninfektionen – grampositive Kokken und gramnegative Bakterien – ausreichend abzudecken (Gustilo et al., 1990; Olson und Schemitsch, 2003).

Die optimale Dauer einer Antibiotikaprophylaxe wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren favorisieren eine dreitägige initiale Antibiotikatherapie und eine weitere dreitägige Antibiotikagabe nach jeder weiteren Intervention (Gustilo et al., 1990). Andere Autoren empfehlen die Fortführung der Antibiotikatherapie für 24 Stunden nach erstmaliger vollständiger Defektdeckung (Gillepsie und Walenkamp, 2010). Für die zusätzliche Applikation von antibiotikabeschichteten Ketten zur lokalen Infektionsprophylaxe gibt es keine ausreichende evidenzbasierte Empfehlung (Henry et al., 1990). Einige Autoren nutzen antibiotikahaltigen Zement als Platzhalter bei großen segmentalen Defekten der Tibia und füllen die um den Zement entstandene synoviaähnliche Fremdkörpermembran nach Entfernung des Zements mit autologem oder allogenen Knochenmaterial auf (Masquelet et al., 2000; Pelissier et al., 2004; Ristiniemi et al., 2007).

Wundmanagement

Vor der operativen Stabilisierung der Fraktur erfolgt innerhalb von sechs Stunden eine ausgiebige Wundtoilette bestehend aus Spülung und Débridement. Dabei wird nekrotisches Weichteil- und Knochengewebe exziiert und ein vitaler Wundgrund geschaffen. Bei drittgradig offenen Frakturen ist aufgrund der massiven Gewebetraumatisierung die initiale Unterscheidung von vitalen und avitalen Arealen nur eingeschränkt möglich, so dass häufig in Intervallen von 48 bis 72 Stunden erneut eine Wundtoilette durchgeführt wird, um nekrotisch gewordenes Gewebe zu entfernen (Sanders et al., 1994). Nach Exzision schließt sich die Spülung mit isotonen Lösungen an, um verbliebenes kontaminiertes Fremdmaterial auszuspülen und die Bakterienlast der Wundfläche zu senken. Anglen (2001) empfiehlt 3 Liter Spülflüssigkeit für Grad I-Frakturen, 6 Liter für Grad II-Frakturen und 9 Liter für Grad III-Frakturen.

Osteosynthese

Für die osteosynthetische Versorgung offener Tibiafrakturen wird der Fixateur externe, die Plattenosteosynthese und die Marknagelosteosynthese angewandt. Der Fixateur externe nimmt insofern eine Sonderstellung ein, da er im Gegensatz zur Platten- und Marknagelosteosynthese als temporäres und definitives Verfahren bis zur vollständigen knöchernen Konsolidierung eingesetzt werden kann (Beardi et al., 2008; French und Tornetta, 2002; Giannoudis et al., 2006a; Melvin et al., 2010b).

Primäre Entscheidungskriterien für die Auswahl des Osteosyntheseverfahrens sind der Allgemeinzustand des Patienten und der Grad der Weichteilverletzung. Mehr als die Hälfte der Patienten sind polytraumatisiert (Court-Brown et al., 2008). Für diese Patienten verbieten sich — bei vitaler Bedrohung — langdauernde umfassende Eingriffe, die zu einer weiteren Kompromittierung des Allgemeinzustandes führen. In diesen Fällen wird zunächst ein Fixateur externe angelegt bis der Patient stabil genug für eine definitive Osteosynthese ist. Ist der Patient akut vital bedroht, und hat zudem eine hochgradige offene Unterschenkelfraktur muss unter Umständen der Unterschenkel amputiert werden um das Leben des Patienten zu retten (Sears et al., 2012; Soni et al., 2012).

Die Plattenosteosynthese wird nur selten am Tibiaschaft angewandt, da sie mit zahlreichen Nachteilen verbunden ist. Um die Platte fest verankern zu können, wird der Knochen großzügig freipräpariert, so dass ein weiterer Weichteilschaden entsteht. Die Knochenperfusion wird insbesondere durch die Freilegung der Tibiavorderkante kritisch reduziert. Gleichzeitig muss die Platte vollständig vom Muskelmantel bedeckt sein. Resultierende Infektionsraten von 32% bei Einzelplattenosteosynthesen und

87,5% bei Doppelplattenosteosynthesen haben dazu geführt, dass die Plattenosteosynthese kaum noch Anwendung findet (Young und Barrack, 1994). Zudem ist die Plattenosteosynthese übungs-, jedoch nicht belastungsstabil und es kommt in 12% zum Materialversagen (Bach und Hansen, 1989).

Die zwei gängigsten Verfahren sind der Verriegelungsmarknagel und der Fixateur externe. Beide haben den Vorteil, dass der Knochen nicht freipräpariert wird und kein zusätzlicher iatrogener Schaden entsteht, so dass die Perfusion des Knochens über periostale Gefäßplexus erhalten bleibt (Young und Barrack, 1994).

Das Prinzip der Marknagelosteosynthese sieht die frakturferne Eröffnung des Markraumes und anschließendes Vorschieben des Implantates vor. Dadurch wird die Fraktur gleichzeitig reponiert und intramedullär geschient. Anschließend wird der Marknagel durch Verriegelungsbolzen gegen Rotation und Dislokation geschützt. Zudem sind verriegelte Marknägel primär belastungsstabil und ermöglichen die rasche Mobilisierung des Patienten (Hohmann et al., 2007).

Das Einbringen des Marknagels in aufgebohrter oder unaufgebohrter Technik wird kontrovers diskutiert. Im Tierversuch führte das Aufbohren des Markkanals zu einer stärkeren Reduktion der endostalen Durchblutung und zusätzlich zu thermalen Nekrosen, so dass häufiger Infektionen, Pseudarthrosen und infizierte Pseudarthrosen beobachtet wurden als bei der Implantation nicht aufgebohrter Marknägel (French und Tornetta, 2002; Klein et al., 1990; Schemitsch et al., 1994 und 1995). Klinische Studien und Metaanalysen konnten diesbezüglich keine statistisch signifikanten Unterschiede aufzeigen, so dass die aufgebohrte Technik zunehmend mehr Anwendung findet. Durch das Aufbohren des Markkanals können stabilere Marknägel mit größerem Durchmesser implantiert werden. Zudem verklemmt sich der Marknagel mit dem Knochen und es resultiert durch die festere Implantat-Knochen-Verbindung eine geringere Rate an Materialversagen, verzögerten Heilungen und Pseudarthrosen (Attal und Blauth, 2010; Bhandari et al., 2001; Finkemeier et al., 2000; Keating et al., 1997).

Beide Techniken reduzieren in unterschiedlichem Ausmaß die intramedulläre Blutversorgung, führen zu einer Erhöhung des Kompartimentdrucks und schwemmen Knochenmark in die systemische Zirkulation ein (Gautier et al., 1992). Eingeschwemmtes Gewebe kann insbesondere bei Patienten mit multiplen Frakturen, Thoraxtrauma und/oder vorbestehenden strukturellen Lungenerkrankungen die Oxygenierung des Blutes kritisch reduzieren. In diesen Fällen ist die primäre Versorgung mit einem Marknagel kontraindiziert (Edwards et al., 1988; Gilepsie und Walenkamp, 2010; Hedequist et al., 1999).

Auch die operative Erfahrung und Fertigkeit des Operateurs sind von Bedeutung. Die achsgerechte Implantation des Marknagels über die Tuberositas tibiae ist technisch wesentlich anspruchsvoller als die Anlage eines Fixateurs externe. Befindet sich die Insertionsstelle medial der Schaftachse entsteht eine Valgus- und bei lateralem Versatz eine Varusfehlstellung. Ein zu weit distaler Eintrittspunkt führt zu einer Rekurvationsstellung. Fehlstellungen wurden, insbesondere bei mehrfragmentären Frakturen, bei bis zu 58% der Marknagelosteosynthesen beobachtet (Freedman und Johnson, 1995). Ein nicht achsgerecht positionierter Marknagel ist weitaus höheren mechanischen Belastungen ausgesetzt und versagt häufiger. In Extremfällen kann es intraoperativ zur Fissurbildung, bis zur Sprengung des Knochens kommen (Ahlers und von Issendorf, 1992).

Das Prinzip des Fixateur externe beruht auf dem perkutanen Einbringen von Pins, die durch äußere Verbindungsstücke baukastenartig starr miteinander verbunden werden und ohne großen Aufwand an nahezu jede Fraktursituation individuell angepasst werden können. Der entscheidende Nachteil liegt in den sogenannten Pin-Track-Infektionen. Der perkutane Pin verbindet den Knochen mit der Umwelt, so dass es unweigerlich zu einer Besiedlung des Pins mit Bakterien der Haut kommt, die in einer durch den Pin fortgeleiteten tiefen Knochen- und Weichteilinfektion münden kann. Je länger der Fixateur verwendet wird, desto höher die Infektionswahrscheinlichkeit. Infektionsraten von 100% wurden bereits beobachtet (Stokel und Sadasivan, 1991), so dass unter Berücksichtigung der Weichteilverhältnisse von der externen Fixation auf eine intramedulläre Osteosynthese umgestiegen wird (Edwards, 1983; Krettek, 2001; Siebenrock et al., 1993).

Für die Behandlung klinisch stabiler Patienten und Patienten mit isolierter offener Tibiaschaftfraktur hat sich zur Auswahl des Osteosyntheseverfahrens die Klassifikation von Gustilo und Anderson durchgesetzt. Für Grad I- Frakturen hat sich die primär definitive Marknagelosteosynthese bewährt (Court-Brown et al., 1990). Für zweitgradig und drittgradig offene Tibiafrakturen hat sich aufgrund der Schwere der Weichteilverletzung zunächst die temporäre Anlage eines Fixateurs externe bewährt, (Bone et al., 1994; Henley et al., 1998; Melvin et al., 2012b, Schandelmaier et al., 1995), obwohl einige Autoren in ausgesuchten Fällen die primäre Marknagelung auch bei Grad IIIA- und IIIB- Frakturen erfolgreich durchgeführt haben (Henley et al., 1998; Schandelmaier et al., 1995, Tornetta et al., 1994; Tu et al., 1995). Die Behandlung von Grad IIIC- Frakturen fokussiert zunächst auf den Versuch der Erhalt der Extremität oder alternativ die primäre Amputation. Das lokale Verletzungsmuster (insbesondere

Gefäß- und Neurostatus) und die Gesamtverletzungsschwere des Polytraumas entscheiden über das weitere Vorgehen nach dem Grundsatz „life bevor limb“. Nach erfolgreicher Wiederherstellung der Perfusion des Unterschenkel wird die Behandlung zunächst mit dem Fixateur externe begonnen (Rixen et al., 2005; Sears et al., 2012; Soni et al., 2012).

Der Verfahrenswechsel von externer Fixation zu intramedullärer Marknagelosteosynthese erfolgt, sobald der Patient durch den Eingriff nicht zusätzlich gefährdet wird und die Weichteilkonsolidierung abgeschlossen ist. Ein Sicherheitsintervall zur Infektionsprophylaxe zwischen Entfernung des Fixateurs externe und Implantation des Marknagels wird als nicht mehr notwendig erachtet (Ueno et al., 2006). Die Infektionsrate ist im Wesentlichen abhängig von der Dauer der externen Fixation (Bhandari et al., 2005).

Wundverschluss

Nach Durchführung der Osteosynthese wird die Wunde primär oder sekundär verschlossen. Ein primär direkter Wundverschluss erfordert eine ausreichende muskuläre Deckung des Knochens und die spannungsfreie Naht der Haut. Dies trifft für Frakturen Grad I bis IIIA zu (Hohmann et al., 2007). IIIB- und IIIC-Frakturen sind definiert durch massive Weichteilschäden mit Deperiostierung des Knochens und erfordern die obligate Rekonstruktion des Weichteilmantels.

Zur Überbrückung bis zum sekundär-definitiven Wundverschluss kann eine Vakuumtherapie (V.A.C= vacuum assisted closure) durchgeführt werden. Dabei wird ein Schwamm in die Wunde eingelegt, mit einer luftdichten Folie versiegelt und über einen Saugnapf, der mit einer Pumpe verbunden ist, wird ein Unterdruck erzeugt. Die Bildung eines vitalen Wundgrundes mit Granulationsgewebe wird beschleunigt (DeFranzo et al., 2001). Die Vakuumtherapie senkt die Rate an freien Lappenplastiken ohne die Infektionsrate zu beeinflussen, so dass dennoch eine zügige Weichteilrekonstruktion angestrebt wird (Bhattacharyya et al., 2008). Die Vakuumtherapie wird auf Grund der geringeren Infektionsrate einer vorübergehenden Wunddeckung mit Kunsthaut (Epigard®) bevorzugt (Labler et al., 2004).

Weichteil- und Knochenrekonstruktion

Die Weichteilrekonstruktion ist essentiell für die Knochenheilung und bietet Schutz vor nosokomialen Infektionen. Über den optimalen Zeitpunkt besteht weiterhin Uneinigkeit. Tendenziell wird eine möglichst frühe Weichteildeckung angestrebt. Rekonstruktive Weichteiloperationen sollten nicht später als 10 Tage nach Trauma erfolgen, da eine

spätere Durchführung mit einer erhöhten Infektionsrate und Versagen von Lappenplastiken assoziiert ist (Fischer et al., 1991). In einer Studie wird sogar die sofortige Durchführung einer Lappenplastik nach unaufgebohrter Marknagelung empfohlen (Tielinen et al., 2007). Andere Autoren hingegen präferieren einen Zeitraum innerhalb von 72 Stunden nach Trauma (Fischer et al., 1991; Godina, 1986).

Für die Weichteildeckung sind zahlreiche Lappenplastiken beschrieben, die sich nach Größe, Volumen und Lokalisation des Defektes richten. Man unterscheidet die Fernlappenplastik von der Nahlappenplastik, die bei einer vorhandenen präparierbaren Gefäßachse als axiale (axial pattern flap) oder gefäßgestielte Lappenplastik bezeichnet wird. Davon zu unterscheiden sind die freien Lappenplastiken ohne definiertes versorgendes Gefäß (random pattern flaps), das heißt mit zufälligem Durchblutungsmuster (Dragu et al.; 2008). Im Mittelpunkt steht, neben der suffizienten Auffüllung des Defektes, die Verbesserung der Vaskularisierung, so dass die alleinige Hauttransplantation deren Versorgung durch Diffusion erfolgt, meist nicht ausreicht.

Eine bessere Vaskularisierung besitzen fasziokutane und myokutane Lappen. Insbesondere verschiedene Formen der Muskellappenplastiken eignen sich zur Deckung des freiliegenden Knochens (Lehnhardt et al., 2004). Dies kann beispielsweise durch einen Gastrocnemiusmuskelklappen oder bei massiver Kontusion der Unterschenkelmuskulatur durch einen gefäßgestielten Muskellappen erfolgen (Cole et al., 1995; Pollak et al., 2000; Yazar et al., 2006).

Zur Rekonstruktion segmentaler Knochendefekte sind verschiedene Formen der Defektdeckung möglich. Für segmentale Defekte >6cm finden osteokutane Lappen Anwendung, von denen der osteokutane Fibulalappen das Standardverfahren darstellt. Alternativen sind die osteokutane Skapula- und Beckenkammplastik (Ostermann und Bora, 1984; Weiland et al., 1983).

Eine andere Möglichkeit stellt die autologe oder allogene Spongiosaplastik dar. Spongiosa, die meist vom Beckenkamm entnommen wird, ist wie eine osteokutane Lappenplastik mit zahlreichen Nachteilen verbunden. Dazu gehört die Verlängerung der Operationsdauer, die Begrenztheit am Ort der Entnahme, eine verminderte mechanische Belastbarkeit der Explantationsstelle, sowie ein Risiko für Blutungen und Infektionen am Ort der Entnahme (Niedhart et al., 2003). Zudem besteht die Gefahr, dass das Transplantat partiell oder als Ganzes nicht anwächst, nekrotisch wird, und entfernt werden muss (Rueger et al., 1996). Kommerziell erhältliche allogene Spongiosa hat den gravierenden Nachteil, dass nach Aufbereitung und Kryokonservierung die Osteoinduktivität verloren geht und das osteogenetische Potenzial rein auf den osteokonduktiven Eigenschaften beruht. Darüber hinaus können

Infektionen vom Spender auf den Empfänger übertragen werden. Dabei stehen Infektionen mit dem HI-Virus oder Hepatitis- Viren an erster Stelle (Niedhart et al., 2003).

Neben der komplikationsreichen, langwierigen und für den Patienten unkomfortablen Kallusdistraktion, sind seit einiger Zeit rekombinant hergestellte Bioproteine zur Induktion der Osteogenese verfügbar, von denen BMP-2 zur Behandlung offener Tibiafrakturen zugelassen ist. In einer multizentrischen prospektiven randomisierten Studie senkte die zusätzliche Applikation von rekombinant hergestelltem Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) in einer Konzentration von 1,5 mg/ml statistisch signifikant die Infektionsrate, die Anzahl sekundärer Eingriffe und beschleunigte die Frakturheilung (Govender et al., 2002). Eine Subgruppenanalyse für Typ IIIA- und IIIB-Frakturen, in die zusätzlich 60 Patienten einer nicht veröffentlichten US-amerikanischen Studie einbezogen wurden, bestätigte die positiven Effekte von rhBMP-2 (Swiontkowski et al., 2006).

1.1.4 Komplikationen und Ergebnisse der Behandlung offener Tibiaschaftfrakturen

Die Komplikationsrate korreliert positiv mit der Klassifikation nach Gustilo und Anderson (Gustilo und Anderson, 1976; Kai et al., 1998). Vier schwerwiegende Komplikationen bestimmen maßgeblich das klinisch erreichbare Behandlungsergebnis. Dies sind tiefe Weichteil- und Knocheninfektionen, die verzögerte oder ausbleibende Frakturheilung, das Kompartmentsyndrom und die Unterschenkelamputation. RhBMP-2 konnte die Rate an diesen Komplikationen in einer 450 Patienten umfassenden prospektiven multizentrischen Studie statistisch signifikant senken. Hauptwirkungsmechanismus scheint die gesteigerte Osteogenese zu sein, die obligat mit einer verstärkten Angiogenese einhergeht (Govender et al., 2002).

Infektion

Schwerwiegendste und therapeutisch komplexeste Komplikation ist die tiefe Knochen- und Weichteilinfektion, die durch osteolytische Prozesse eine Frakturkonsolidierung verhindert und bei Persistenz unweigerlich in einer infizierten Pseudarthrose mündet. Für posttraumatische Infektionen sind vor allem Bakterien relevant. Pilze, Parasiten und Viren spielen eine untergeordnete Rolle. Erstgradige Frakturen haben kumulativ eine Infektionsrate von 1,8% im Vergleich zu 17,5% bei drittgradig offenen

Tibiaschaftfrakturen (Court-Brown et al., 1991). Die Terminologie einer Knocheninfektion wird nicht stringent verwendet. Die Osteitis entsteht durch einen zentripetalen und die Osteomyelitis durch einen zentrifugalen Infektionsweg, so dass hier für die posttraumatische Infektion durch exogene bakterielle Kontamination der Begriff der Osteitis verwendet wird. Bestehen klinische Symptome, wie Schmerz, Schwellung, Rötung, Sekret- und Eitersezernierung über vier Wochen hinaus, spricht man von einer chronischen Infektion, die sich meist posttraumatisch entwickelt (Schnettler und Alt, 2004).

Mehr als die Hälfte der Knocheninfektionen werden durch Staphylokokken verursacht. Der absolut häufigste Erreger ist *Staphylococcus aureus* mit einem Anteil von 35%, von denen 19% Methicillin-resistent sind, entsprechend 7% der Gesamtinfektionen. Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) verursachen 13-16% der Infektionen, gefolgt von Enterokokken (13%) und Enterobakterien (11-12%) (Scheithauer et al., 2012). Schätzungen gehen davon aus, dass 44% der Infektionen nosokomialen Ursprungs sind (Patzakis und Wilkins, 1989).

Ursachen für die Häufigkeit von staphylogenen posttraumatischen Infektionen sind einerseits immundefizitäre devaskularisierte und nekrotische Gewebeareale an die Staphylokokken über adhäsive Oberflächenmoleküle, sogenannte MSCRAMMs (microbial surface components recognising adhesive matrix molecules), binden können, und andererseits die Kolonisierung des einliegenden Osteosynthesematerials.

Sowohl devitalisiertes Gewebe, als auch Fremdkörperoberflächen prädisponieren zur Biofilmbildung (Akiyama et al., 2007; Ziran, 2007). Der Biofilm bietet effektiven Schutz vor der Immunantwort des Wirtes und erhöht zur Eradikation erforderliche Antibiotikakonzentrationen um den Faktor 1000 (Xu et al., 2000). Zudem können einige in Biofilm eingebettete Bakterienstämme von einer stoffwechselaktiven planktonischen Form in eine metabolisch sehr ökonomische sessile Form übergehen, die zusätzlich durch eine reduzierte Aufnahme von Antibiotika vor hohen intrabakteriellen Antibiotikakonzentrationen schützt (Beveridge et al., 1997). Einige Stämme von *Staphylococcus aureus* besitzen als Besonderheit die Fähigkeit als sogenannte „small colony variants“ endozytotisch in Osteoblasten, als auch Endothel- und Epithelzellen aufgenommen werden zu können. Die intrazelluläre Persistenz scheint Ursache für wiederholt erfolglose Eradikationsversuche und Rekurrenz der Infektion zu sein (Reott et al., 2008).

Die Therapie der Osteitis trägt dem pathophysiologischen Entstehungsmechanismus Rechnung, indem avitales Knochen- und Weichteilgewebe radikal reseziert wird und

der Defekt durch rekonstruktive Weichteil- und Knochenoperationen – mit dem Ziel der Revaskularisierung – gedeckt wird. Nur bei innerhalb von sechs Wochen auftretenden Frühinfektionen und stabilen Knochenverhältnissen kann versuchsweise das Osteosynthesematerial *in-situ* belassen werden. Spätinfektionen und/oder instabile Knochenverhältnisse erfordern das Entfernen des Osteosynthesematerials und Konversion zu externer Fixation. Zusätzlich wird eine systemische Antibiotikatherapie begonnen, die durch antibiotikabeschichtete Ketten um eine lokale Therapie ergänzt wird (Mouzopoulos et al., 2011). Kann die Infektion über einen langen Zeitraum nicht kontrolliert werden oder ist mehrfach rekuriert, muss mit dem Patienten eine Amputation diskutiert werden, um transiente Bakteriämien mit etwaigen metastatischen Bakterienabsiedlungen, Dauerhospitalisierung, soziales Abgleiten, finanzielle Einbußen und psychische Alterationen zu vermeiden (Ekkernkamp et al., 1996).

Verzögerte und ausbleibende Frakturheilung

Die verzögerte Frakturheilung stellt die häufigste Komplikation dar und wird bei 22% der offenen Tibiafrakturen, die mit einem unaufgebohrten Marknagel und bei 24% der mit einem Fixateur externe versorgten offenen Tibiaschaftfrakturen beobachtet (Giannoudis et al., 2006a). Mit zunehmendem Schweregrad kommt es zu einer überproportionalen Zunahme, so dass für IIIB- Frakturen über eine Rate an verzögerten Frakturheilungen von bis zu 80% berichtet wird, von denen weniger als 50% knöchern konsolidieren. Dies erklärt Pseudarthrosenraten von bis zu 54% bei IIIB- Frakturen (Papakostidis et al., 2011).

Zwei hauptsächliche Faktoren führen zu einer verzögerten oder ausbleibenden Frakturheilung. Durch mangelnde Fixation bedingte übermäßige Bewegungen der Fraktarenden gegeneinander kommt es zu einer frustranen Osteogenese mit überschießender Kallusbildung, im Sinne einer hypertrophen Pseudarthrose, ohne dass eine knöcherne Fusion erreicht wird. Die Therapie sieht die Resektion überschüssig gebildeten Kallus und verbesserte Fixation der Fraktur – vorzugsweise mit einem aufgebohrten Marknagel – vor. Auf der anderen Seite kann eine mangelnde Vaskularisierung zum völligen Ausbleiben osteogener Prozesse im Frakturbereich führen, was als hypotrophe Pseudarthrose bezeichnet wird. Hauptrisikofaktoren sind neben der Destruktion des Weichteilmantels, die periphere arterielle Verschlusskrankheit und die diabetische Angiopathie. Das Therapieprinzip sieht die Revaskularisierung und Defektauffüllung mit osteogenem Material vor (Einhorn, 1999; Marsh, 1998; Krötz et al., 2004; Rüter et al., 1999; Schweiberer et al., 1999).

Kompartmentsyndrom

Das Kompartmentsyndrom wird bei 6-9% der offenen Tibiafrakturen beobachtet, von denen 83% drittgradig offene Schaftfrakturen sind (Blick et al., 1986; DeLee und Stiehl, 1981; Larsson und von der Linden, 1983). Ausgelöst wird das Kompartmentsyndrom durch die ödematöse Schwellung der Muskeln innerhalb einer Muskelfaszie nach Trauma. Die Unterschenkelmuskulatur wird durch vier umhüllende Faszien in vier Kompartimente geteilt. Am häufigsten entsteht ein Kompartmentsyndrom in der Tibialis- anterior-Loge (Blicke et al., 1986).

Durch die intakte begrenzende Faszie steigt der intrakompartimentale Druck an und behindert zunächst den Blutabfluss im venösen Schenkel des Kapillarbettes. Das Bein nimmt an Umfang zu und präsentiert sich klinisch prall- elastisch. Durch die venöse Stauung steigt der intrakompartimentale Druck weiter an. Bei Drücken über 20 mmHg wird ein kritischer Druck erreicht, der zu einer kritischen Reduktion der arteriellen Perfusion im Bereich der Mikrozirkulation führt. Klinisches Korrelat der Minderperfusion ist der dumpfe Ischämieschmerz. Das Kompartmentsyndrom ist eine klinische Diagnose. Eine intrakompartimentale Druckmessung kann hilfreich zur Diagnosestellung sein, schließt ein Kompartmentsyndrom aber nicht aus (White et al., 2003).

Die Kombination aus klinischem Bild und Hochrasanztrauma stellt die rechtfertigende Indikation zur unverzüglichen Druckentlastung durch Fasziotomie der vier Kompartimente des Unterschenkels dar (Maheshwari et al., 2008). Dabei wird nekrotisches Gewebe abgetragen und die Wunde vorübergehend durch eine V.A.C.-Anlage geschützt (Olson und Glasgow, 2005; Zannis et al., 2009). Der endgültige Wundverschluss kann einzzeitig oder etappenweise mit Nachlassen der Schwellung erfolgen (Janzig und Broos, 2001). Die Phase der reduzierten Perfusion bei einem manifesten Kompartmentsyndrom verzögert die Frakturheilung (Reverte et al., 2011) und führt in bis zu 38% zu einer Knochen- und Weichteilinfektion (Johnson et al., 1992).

Amputation

Man unterscheidet die primäre von der sekundären Amputation. Für die primäre Amputation bestehen zwei Indikationen. Zum einen erfolgt sie unmittelbar nach innerklinischer Stabilisierung der Kreislaufparameter vital bedrohter Patienten mit drittgradig offenen Schaftfrakturen deren Gesamtschwere der Verletzungen eine medizinisch ausreichende Frakturversorgung nicht zulässt. Zum anderen kann sie bei ausgeprägten nicht rekonstruktionsfähigen neurovaskulären Schäden indiziert sein. Die Amputationsrate von IIIB- und IIIC- Frakturen beträgt 6,2%, respektive 79,6%

(Papakostidis et al., 2011). Die sekundäre Amputationsrate beträgt 5,1% für IIIB- und 27,7% für IIIC- Frakturen. Ursächlich sind protrahierte Ischämien mit ausgeprägten Nekrosen, Versagen der Weichteil- und Knochenrekonstruktion, akute nicht kontrollierbare Infektionen und irreversibler Funktionsverlust des Unterschenkels durch Destruktion nervaler Strukturen (Saddawi-Konefka et al., 2008).

Andere Komplikationen, die das erzielte Behandlungsergebnis trüben, sind persistierende Schmerzen (Hertel et al., 1996), Verkürzung der Extremität (Georgiadis et al., 1993; Schandelmaier et al., 1997) und Bewegungsdefizite im Knie- und Sprunggelenk (Gopal et al., 2004).

1.2 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

Wachstumsfaktoren sind Proteine, die auf responsive Zellen autokrin, parakrin oder endokrin wirken können (Liebermann et al., 2002). Der Anteil der Wachstumsfaktoren im Knochengewebe beträgt weniger als 1% der nichtkollagenen Proteine. Sie beeinflussen die Zellteilung, die Matrixsynthese und die Gewebsdifferenzierung, und haben somit eine entscheidende Rolle bei der Knochen- und Knorpelbildung, sowie der Reparatur muskuloskelettaler Gewebe (Bostrom et al., 1996 und 1999).

1965 entdeckte Urist, dass dekalzifizierte Knochenmatrix in Muskelgewebe injiziert zur ektopen Knochenbildung führt (Urist, 1965). 1981 wurde der osteoinduktive Effekt sowohl für die enchondrale als auch die direkte desmale Knochenbildung beobachtet (Reddi, 1981). Wozney et al. (1988) identifizierten die genetische Sequenz der Bone Morphogenetic Proteins und damit die verschiedenen Isoformen. Die Gruppe der BMPs gehören zur TGF- β - Superfamilie (Transforming Growth Factor; (Abb. 2)), zu der ebenfalls die TGF- β 1 bis TGF- β 5 Isoformen, GDF (Growth and Differentiation Factor), Activin, Inhibin und Müllerian Substanz gehören (Kingsley, 1994; Liebermann et al., 2002). Mehr als 47 verschiedene BMPs wurden bisher identifiziert (Chubinskaya und Kuettner, 2003).

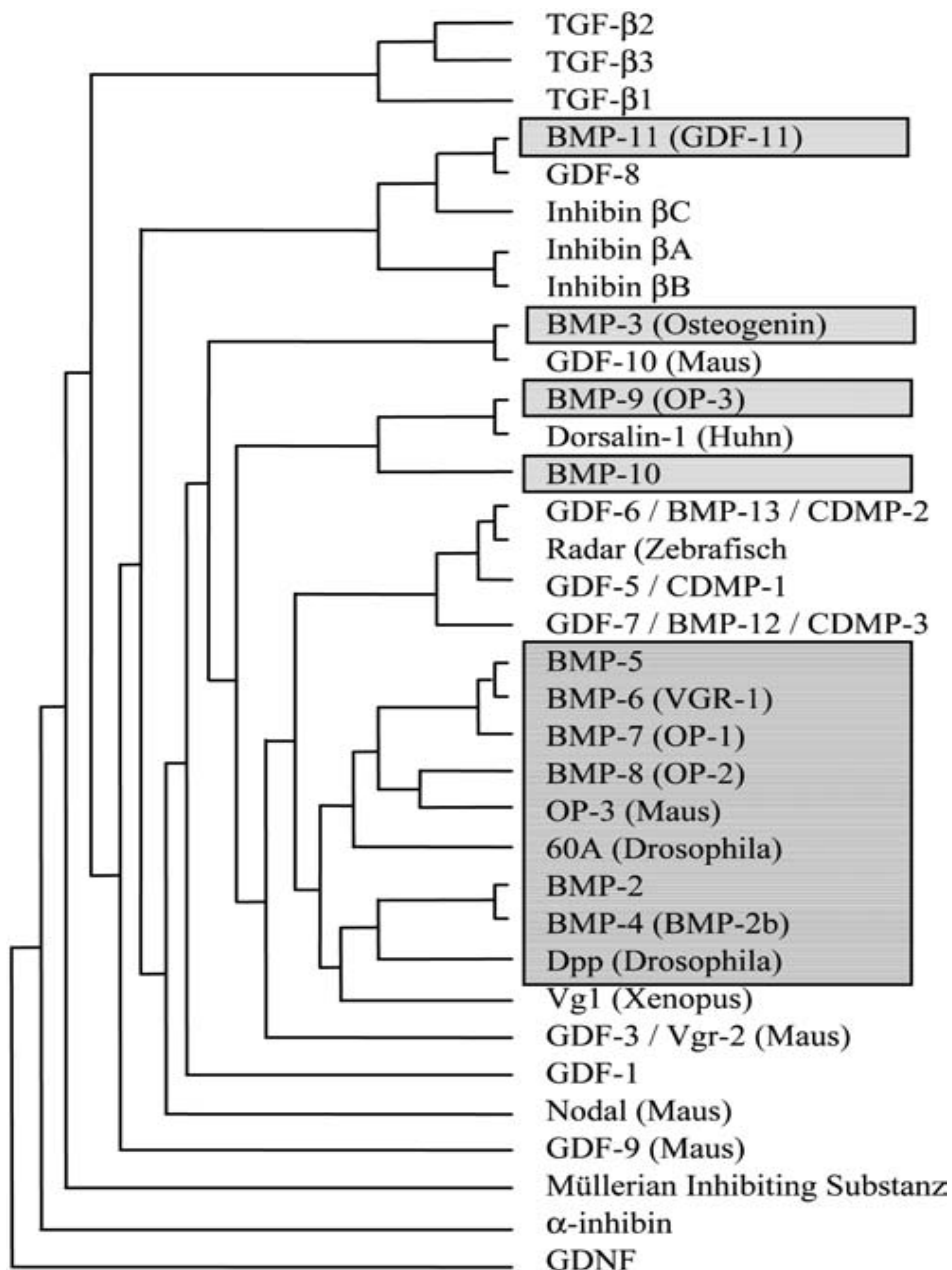


Abbildung 2: Mitglieder der TGF-β- Superfamilie
Aus: Bramlage et al., 2005.

Alle Proteine der TGF-β- Superfamilie binden extrazellulär an Serin- / Threonin-Kinase-Rezeptoren (Ten Dijke et al., 1994). Der Effekt von BMPs wird über 2 heteromere Rezeptoren vermittelt (Abb. 3). Nach Bindung des Liganden phosphoryliert die aktive Typ-II- Kinase den Typ-I- Rezeptor an spezifischen Serin- und Threonin- Resten. Der aktivierte Typ-I- Rezeptor initiiert die intrazelluläre Signaltransduktion durch Phosphorylierung von spezifischen Proteinen, den Smads. Anschließend bilden verschiedene Smads heteromere Komplexe, die in den Zellkern überführt werden und direkt oder indirekt über Transkriptionspartner an spezifische DNA-Sequenzen in den

Promotorregionen der Zielgene binden und deren Transkription regulieren können (Kawabata et al., 1998; Massague, 1998; ten Dijke et al., 2003).

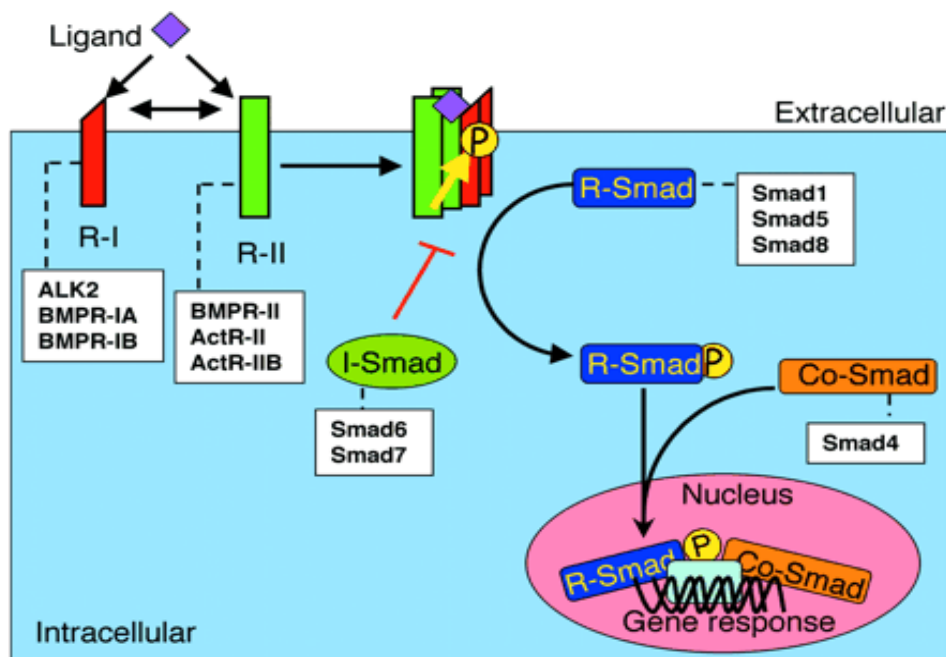


Abbildung 3: Signaltransduktion via BMP- Rezeptoren
Aus: ten Dijke et al., 2003.

Die multifunktionell wirkenden BMPs sind von entscheidender Bedeutung bei der Entwicklung von Wirbel- und wirbellosen Tieren. BMPs regulieren die Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung und Morphogenese nahezu aller Organe und Gewebe eines Organismus (Goumans und Mummery, 2000; Hogan, 1996; Jena et al., 1997; Onishi et al., 1998; Zhang und Bradley, 1997). BMP- Nullmutationen führen meist zum Tod des Embryos beziehungsweise zu schweren Anomalien des skelettalen Systems und innerer Organe (Ducy und Karsenty, 2000; Wozney, 2002; Zheng et al., 1994). Defekte im Gen von BMP-2 können zu einer autosomal- dominanten Fibrodysplasia ossificans progressiva führen (Kaplan et al., 1990; Rao et al., 1992; Tabas et al., 1991). BMPs nehmen Einfluss auf endotheliale, mesenchymale und knochenspezifische Zellen. Sie erhöhen die alkalische Phosphataseaktivität und verstärken die Kollagensynthese (Hiraki et al., 1991; Hughes et al., 1995; Takuwa et al., 1991). BMPs verfügen außerdem über die Fähigkeit Stamm- und Knochenvorläuferzellen zu Chondrozyten bzw. Osteoblasten zu differenzieren. (Yamaguchi et al., 1991). Neben systemischer Rekrutierung (Kwong und Harris, 2008) gelten als mögliche Quellen für mesenchymale Stammzellen das Periost (Nakase et al., 1994), das endostale Markstroma (Bianco und Riminucci, 2001; Jaiswal et al., 1997; Sekiya et al., 2002) und das Muskelgewebe (Urist, 1965; Abb. 4).

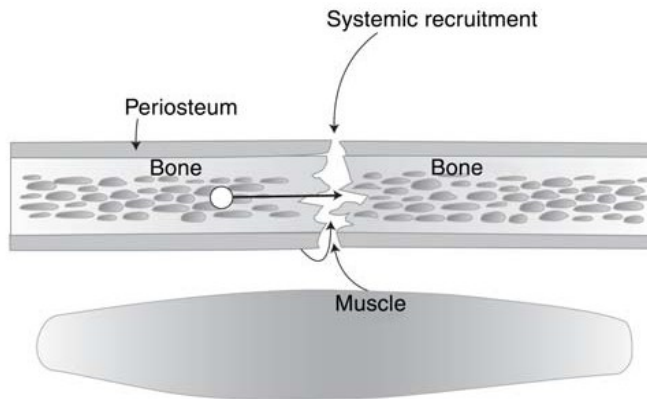


Abbildung 4: Mögliche Quellen zur Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen
Aus: Kwong und Harris, 2008.

Auf Grund der Heterogenität der Gruppe der BMPs können nicht alle Mitglieder, wie ursprünglich vermutet, ektop die Knochenneubildung induzieren (Reddi, 1998; Sampath et al., 1992).

Cheng et al. (2003) zeigten, dass BMP-2, -6, und -9 über das größte osteogenetische Potential verfügen, sowie in etwas geringerem Maße BMP-4 und -7. Die extrem aufwendige Isolierung von BMPs mit Ausbeuten von 1 µg aus 1 kg Knochensubstanz (Wang et al., 1988) führte zur raschen Entwicklung der Herstellung von rekombinanten humanem BMP-2 (Ruppert et al., 1996; Vallejo et al., 2002; Vallejo und Rinas, 2004; Wang et al., 1990; Maruoka et al., 1995). Die biologische Aktivität von rhBMP-2 beträgt weniger als 10% der von physiologischem humanem BMP-2 (Bessho et al., 1999).

Exogenes rhBMP-2 induziert die Differenzierung von MSCs in osteoblastäre und chondrozytäre Zellen (Katagiri et al., 1990; Wang et al., 1993) und stimuliert die Synthese von Kollagen, Osteocalcin und alkalischer Phosphatase in Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Knochenmarksstromazellen (Takuwa et al., 1991; Thies et al., 1992; Yamaguchi et al., 1991). Es regt Osteoblasten zur Proliferation an (Ghosh-Choudhury et al., 1995), veranlasst Myoblasten zu Osteoblasten zu differenzieren (Katagiri et al., 1994), lockt Osteoblasten chemotaktisch an und stimuliert die Expression von Insulin-like growth factor I ((IGF-I); (Canalis, 1994)), Interleukin 6 (IL-6) und TGF-β in Osteoblasten ((Zheng und Bradley, 1994); (Abb. 5)).

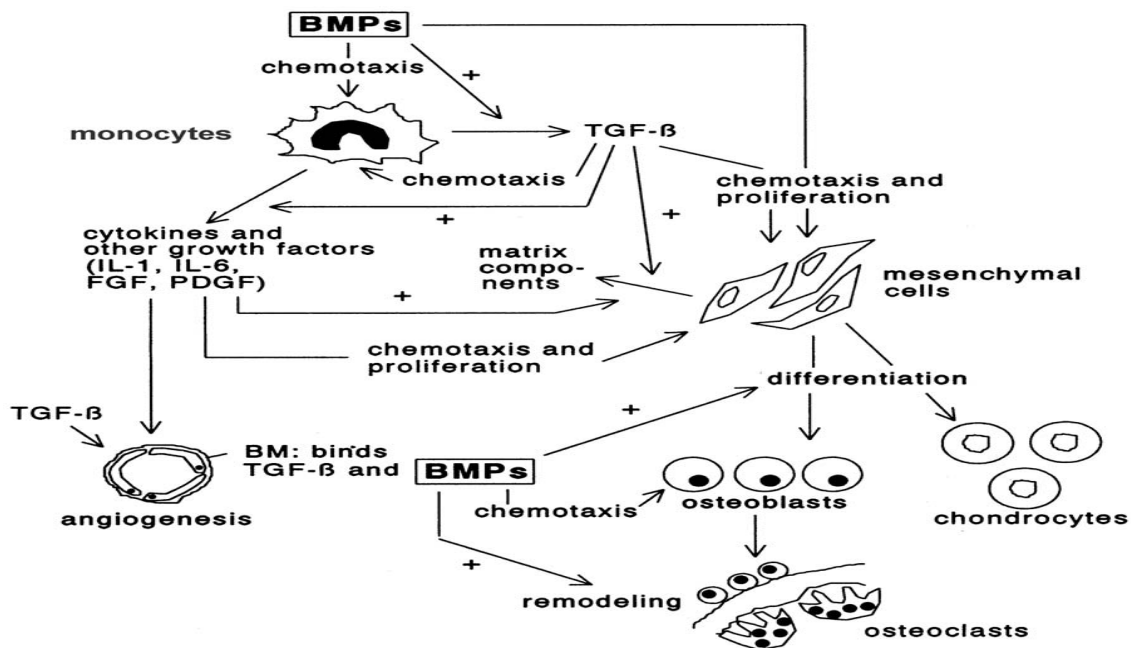


Abbildung 5: Effekte von BMPs
Aus: Termaat et al., 2005.

Die Wirkung von BMPs ist dosisabhängig. Eine effektive Osteoinduktion wird erst bei Applikation einer Minstdosis erreicht. Eine Erhöhung der BMP- Dosis führt zu einer früheren und vermehrten Knochenbildung. Dabei kann unter Umgehung der enchondralen Ossifikation Knochen desmal gebildet werden (Ripamonti et al., 1996; Valentin-Opran et al., 2002). Extreme BMP- Dosen führen – verbunden mit lokaler Knochenresorption – zur Verstärkung der osteoklastischen Aktivität, so dass eine speziesspezifische Maximaldosis nicht überschritten werden sollte (Sampath et al., 1992; Sandhu et al., 1995; Valentin-Opran et al., 2002). Darüber hinaus werden vermehrt BMP-2- Antagonisten im Sinne eines negativen Rückkopplungssystems sezerniert um überschießende Kallusbildung zu verhindern. Zu den Antagonisten gehören Chordin, Noggin, Mitglieder der Dan-Familie wie Gremlin, Sclerostin, uterine sensitization associated gene (USAG-1), Cerberus, Caronte, protein related to Dan and Cerberus (PRDC) und Dante. Eine Überexpression von BMP-2- Antagonisten verhindert das Remodelling und führt zu osteoporotisch verändertem Knochen (Abe, 2006; Gaggero und Canalis, 2006; Gaggero et al., 2006).

BMP-2 in Lösung diffundiert rasch weg und wird zudem durch unspezifische Gewebsproteasen hydrolysiert, so dass hohe Dosen von BMP-2 appliziert werden müssten. Für rhBMP-2 hat sich deshalb die Kopplung an kollagene Typ I -Schwämme als Trägermaterial bewährt (Hollinger et al., 1998). Sie gelten als hochgradig biokompatibel. Nur selten werden Abwehrreaktionen mit messbarem Antikörpertiter –

die keinen Einfluss auf die Knochenbildung zu scheinen haben – beobachtet (Geesink et al., 1999). Nach Applikation wird initial eine bestimmte Menge rhBMP-2 freigesetzt. Anschließend erfolgt eine eher graduelle Freisetzungskinetik (Hollinger et al., 1998). Die Degradation des Trägermaterials nach Implantation unterstützt die Freisetzung von rhBMP-2 und ermöglicht einen vollständigen Ersatz durch Knochensubstanz (Hollinger und Leong, 1996). Der Abbau kollagener Carrier erfolgt zellunabhängig durch das vorherrschende chemische Milieu. Eine verzögerte Biodegradation behindert die Osteogenese. Hingegen kann eine verfrühte Biodegradation mit exzessiver Freisetzung von rhBMP-2 zu einem fibrösen Einwachsen des Trägers und konsekutiver mechanischer Instabilität führen. Knochenbildung und Degradation sollten deshalb miteinander einhergehen. (Asahina et al., 1997). Der Zusatz von BMP-2 beschleunigt die Resorptionsrate des Trägers (Ripamonti et al., 1996). Die geometrischen Eigenschaften des Carriers beeinflussen die Freisetzungskinetik des Wirkstoffs, die Biodegradation des Carriers und die Bindung des Knochens an das Implantat. Ungünstig sind feste glatte Scheiben mit geringer Oberfläche. Als günstig haben sich poröse Materialien mit großer Oberfläche als Scheiben oder Blöcke erwiesen, die viel rhBMP-2 inkorporieren und wieder freisetzen können (Kuboki et al., 1998).

BMP-2 zählt somit zu den am genauesten erforschten Proteinen und konnte seine osteoinduktiven Eigenschaften in zahlreichen präklinischen (Boden et al., 1999; Bostrom et al., 1995; Bouxsein et al., 2001; Fischgrund et al., 1997; Hofbauer et al., 1998; Mc Kay et al., 2002; Miyazawa et al., 1996; Siggelkow und Hufner, 1999; Toriumi et al., 1991; Yasko et al., 1992) und klinischen Studien unter Beweis stellen (Boden et al., 2000; Boyne et al., 1997; Burkus et al., 2003). Neben BMP-7 (Burkus et al., 2002a; Burkus et al., 2002b; Friedlaender et al., 2001, Geesink et al., 1999; Johnsson et al., 2002; Ronga et al., 2006) konnte rhBMP-2 seine Wirksamkeit in einer Phase-II-Studie unter Beweis stellen (Govender et al., 2002). In der Europäischen Union ist rhBMP-2 als Implantationskit InductOs™ für offene Tibiafrakturen seit 2003 durch die Europäische Agentur für die Beurteilung von Arzneimitteln zugelassen. Das Kit besteht aus einem Rinderkollagenschwamm, der mit einer rhBMP-2-Lösung getränkt und in die Fraktur implantiert wird. Die kollagene Matrix begünstigt das Einwachsen von Kapillaren und verfügt dadurch über osteokonduktive Eigenschaften.

1.3 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Effekte von osteoinduktivem, rekombinant hergestelltem, humanen BMP-2 (rhBMP-2) auf die Infektionsentwicklung und Knochenbruchheilung bei bakteriell, mit *Staphylococcus aureus*, kontaminierten Tibiaschaftosteotomien an Ratten zu untersuchen. Hierzu wurde in einem etablierten Rattenmodell der Osteotomiespalt am Tibiaschaft – nach Osteosynthese mit einem intramedullären Implantat – mit *Staphylococcus aureus* kontaminiert. Anschließend wurden die Effekte von rhBMP-2 auf die Infektionsentwicklung und Knochenbruchheilung klinisch und mit Hilfe von mikrobiologischen, bildgebenden und biomechanischen Methoden untersucht. Als Hypothese wird angenommen, dass der osteoinduktive und pro-angiogenetische Effekt von rhBMP-2 zu einer Reduktion an infizierten Pseudarthrosen im Vergleich zur rhBMP-2- freien Therapie führt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

- | | |
|---|---|
| ➤ Digitalkamera Polaroid i834 | Fa. Polaroid Cooperation, Concord, USA |
| ➤ Digitales Röntgen | Fa. Oehm & Rehbein GmbH, Rostock, Ger |
| ➤ Elektronenmikroskop Leo 1530 | Fa. LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen, Ger |
| ➤ Federzugwaage | Fa. PCE Group, Meschede, Ger |
| ➤ FT Configurator | Fa. Instron Ltd, High Wycombe, UK |
| ➤ Kraftmessdose | Fa. Instron Ltd, High Wycombe, UK |
| ➤ Microsoft Excel 2007 | Fa. Microsoft, Redmond, USA |
| ➤ µCT 80 | Fa. Scanco Medical AG, Bassersdorf, CH |
| ➤ Präzisionswaage ED | Fa. Sartorius, Göttingen, Ger |
| ➤ Röntgen Gierth HF 300 | Fa. Gierth X-Ray International GmbH, Riesa, Ger |
| ➤ RS- Labside | Fa. Instron Ltd, High Wycombe, UK |
| ➤ SC7640 Sputter Coater | Fa. VG Microtech, Uckfield, East Sussex, GB |
| ➤ IBM SPSS 18 Statistics | Fa. SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA |
| ➤ Servohydraulische Testmaschine Instron 8874 | Fa. Instron Ltd, High Wycombe, UK |
| ➤ Tissue Grinder Polytron 2100 | Fa. Kinematica AG, Littau, CH |
| ➤ Vortex Reax Control | Fa. Heidolph Elektro GmbH, Keilheim, Ger |

2.1.2 Medikamente

- | | |
|--------------------------|---|
| ➤ Atropinsulfat | Fa. B. Braun AG, Melsungen, Ger |
| ➤ Carprofen (Rimadyl®) | Fa. Pfizer GmbH, Berlin, Ger |
| ➤ Ceftriaxon (Rocephin®) | Fa. Roche Consumer Health Deutschland GmbH, Eppstein, Ger |

- Ketamin (Ketanest®) Fa. Pfizer GmbH, Karlsruhe, Ger
- Xylazin (Rompun®) Fa. Bayer Health Care, Leverkusen, Ger

2.1.3 OP-Materialien

- Abdecktuch Fa. Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath-Untersfeldhaus, Ger
- chirurgische Pinzette Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, Ger
- Drahtschneidezange Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, Ger
- Einwegrasierer Fa. Dr. Junghans Medical GmbH, Bad Lausick, Ger
- Einwegskalpell Fa. Dr. Junghans Medical GmbH, Bad Lausick, Ger
- Elektrorasierer Fa. Wahl GmbH, Unterkirnach Ger
- Enthaarungscreme Fa. GlaxoSmithKline, Bühl, Ger
- Fadenhalter Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, Ger
- Flachmeißel Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, Ger
- Hautklammergerät Fa. B. Braun AG, Melsungen, Ger
- Kanüle 21 G (Ø 0,8 mm) Fa. B. Braun AG, Melsungen, Ger
- Kanüle 23 G (Ø 0,6 mm) Fa. B. Braun AG, Melsungen, Ger
- Lochtuch Fa. Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath-Untersfeldhaus, Ger
- Mundschutz Fa. Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath-Untersfeldhaus, Ger
- OP- Einwegmantel Fa. Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath-Untersfeldhaus, Ger
- OP- Handschuhe Fa. Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath-Untersfeldhaus, Ger
- OP- Haube Fa. Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath-Untersfeldhaus, Ger
- Overholt- Klemme Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, Ger
- Säge Fa. Synthes GmbH, Freiburg, Ger
- Povidon- Iodlösung (10%ig) Fa. B. Braun AG, Melsungen, Ger
- Prolene- Nahtmaterial (3-0) Fa. Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Ger
- Spritze 1 ml Fa. B. Braun AG, Melsungen, Ger
- Spritze 5 ml Fa. B. Braun AG, Melsungen, Ger

- Sprühpflaster Fa. Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Ger
- Tupfer steril Fa. IVF Hartmann AG, Heidenheim, Ger
- Vicryl- Nahtmaterial (3-0) Fa. Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Ger

2.1.4 Basismedien, Zusätze, Chemikalien, Kits

- API bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Ger
- Argon 4,8 Fa. Edwards GmbH, Kirchheim, Ger
- BHI-Agarplatten Institut für medizinische Mikrobiologie, Gießen, Ger
- BHI-Lösung Fa. Mast Diagnostica Laboratoriumspräparate GmbH, Reinfeld, Ger
- Cryoröhrchen Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Ger
- Drigalskispatel Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Ger
- Ethanol 96% Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Ger
- Glycerinlösung Fa. Euro OTC Pharma GmbH, Bönen, Ger
- Petrischalendrehteller Fa. Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen, Ger
- Pipette 1 ml Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Ger
- Pipette 0,1 ml Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Ger
- Pipettenspitzen Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Ger
- Saccharase- Lösung Fa. Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen, Ger
- rhBMP-2 Kit Fa. Medtronic Biologics, Memphis, USA
- Technovit 3040® Fa. Heraeus Kulzer, Wehrheim, Ger
- PBS-Puffer Fa. Genaxxon BioScience GmbH, Ulm, Ger
- NaCl (0,9%) Fa. B. Braun AG, Melsungen, Ger
- *Staphylococcus aureus* Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen, Ger
- 10 ml Röhrchen Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Ger
- 1,5 ml Röhrchen Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Ger

2.1.5 Versuchstiere

Die Tierexperimente wurden zuvor durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (Erfurt, Referenz- Nr. 14-03/07) genehmigt. Die 42 ausgewachsenen Sprague- Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 320–430 g wurden zwei Wochen vor der Operation von Ronald Krieg (Wünsch/Niederwünsch, Thüringen) bezogen. Die Haltung erfolgte paarweise bei handelsüblichem Futter und Wasser ad libitum in Makrolonkäfigen. Die adäquate veterinärmedizinische Betreuung und Versorgung der Versuchstiere wurde durch die Mitarbeiter des Forschungszentrums für Medizintechnik und Biotechnologie GmbH in Bad Langensalza sichergestellt.

2.1.6 Bakterien

Ein *Staphylococcus aureus* Stamm, gewonnen aus einem Wundisolat eines Patienten mit einer Weichteilinfektion, diente zur Induktion der postoperativen Infektion. Der Stamm wurde durch den Analytischen-Profil-Index (API) biochemisch charakterisiert und als EDCC 5055 (Eugen Domann Culture Collection Nr. 5055, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen) benannt. Er verfügt über eine ausgeprägte hämolytische Aktivität und Biofilmbildungskapazität.

Für die Herstellung einer benötigten Inokulationsdosis wurde eine auf Schafsblutagar gewachsene Einzelkolonie in 20 ml BHI (brain heart infusion) überführt und für mindestens sechs Stunden bei 37° C unter kontinuierlichem Schütteln bebrütet. Die Lösung war deutlich trüb. Jeweils 1 ml aus der 20 ml Kulturflasche wurden zuvor entnommen und in vier 1,5 ml Tubes (4 x 1 ml) überführt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 13500 upm (Umdrehungen pro Minute) für fünf Minuten pelletiert. Die entstandenen vier Bakterienpellets wurden in ein mit 1 ml BHI/Glycerin 20% gefülltes 1,5 ml Tube resuspendiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis, um weiteres Bakterienwachstum zu verhindern und korrekte Ergebnisse beim Auszählen zu erhalten. In 10er Schritten wurden die vier Ansätze bis zur Verdünnungsstufe 10^{-10} verdünnt. Hierzu wurden in die Cryoröhrchen 900 µl BHI/Glycerin 20% vorgelegt und beginnend mit der Originalsuspension (1 ml) wurden jeweils 100 µl überführt und sorgfältig vermischt. Von den jeweiligen Verdünnungsstufen wurden jeweils 100 µl mit dem Drigalskispatel auf BHI-Agarplatten ausplattiert. Anschließend wurden die Agarplatten für eine Nacht bei 37° C bebrütet. Die Originalsuspension und die Verdünnungsreihen wurden bei -80° C eingefroren. Zum Auszählen sollte der

Durchmesser einer Einzelkolonie maximal 1 mm betragen. Die Agarplatten wurden ausgezählt und entsprechend der erhaltenen Ergebnisse wurde das benötigte Volumen einer entsprechenden Inokulationsdosis in ein Cryoröhrchen pipettiert und bei -80° C eingefroren.

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign

Zuerst wurde durch eine 20 Versuchstiere umfassende zweiteilige Pilotstudie, verteilt auf 10 Gruppen, mit oder ohne systemischer Antibiose (Ceftriaxon 50 mg/kg Körpergewicht s.c.) für 14 Tage, die geeignete Bakterieninokulationsdosis und rhBMP-2 Konzentration ermittelt. Der 6 Gruppen (Gruppe 1-6) umfassende erste Teil (Tab. 2) mit 12 Tieren diente zur Keimdosisfindung und beinhaltete keine postoperative Antibiotikaphylaxe. Der zweite 4 Gruppen (Gruppe 7-10) umfassende Pilotstudienabschnitt wurde zur Beurteilung einer in der klinischen Anwendung bewährten Ceftriaxon-Antibiotikaphylaxe genutzt (Tab. 3). Gruppe 1: 10^3 koloniebildende Einheiten (KBE) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ohne rhBMP-2; Gruppe 2: 10^3 KBE *Staphylococcus aureus* mit 175 µg rhBMP-2 entsprechend einer Konzentration von 1,75 mg/ml; Gruppe 3: 10^5 KBE *Staphylococcus aureus* ohne rhBMP-2; Gruppe 4: 10^5 KBE *Staphylococcus aureus* mit 175 µg (1,75 mg/ml) rhBMP-2; Gruppe 5: 10^7 KBE *Staphylococcus aureus* ohne rhBMP-2 ; Gruppe 6: 10^7 KBE *Staphylococcus aureus* mit 175 µg (1,75 mg/ml) rhBMP-2; Gruppe 7: 10^3 KBE *Staphylococcus aureus* ohne rhBMP-2 mit systemischer Antibiose; Gruppe 8: 10^3 KBE *Staphylococcus aureus* mit 200 µg rhBMP-2, entsprechend einer Konzentration von 2 mg/ml, und systemischer Antibiose; Gruppe 9: 10^5 KBE *Staphylococcus aureus* ohne rhBMP-2 mit systemischer Antibiose; Gruppe 10: 10^5 KBE *Staphylococcus aureus* mit 200 µg (2 mg/ml) rhBMP-2 und systemischer Antibiose.

	Keine systemische Antibiose			
	kein rhBMP-2		175 µg rhBMP-2 Konzentration: 1,75 mg/ml	Total
10 ³ KBE <i>S.aureus</i>	(Gruppe 1)	2	(Gruppe 2) 2	4
10 ⁵ KBE <i>S.aureus</i>	(Gruppe 3)	2	(Gruppe 4) 2	4
10 ⁷ KBE <i>S.aureus</i>	(Gruppe 5)	2	(Gruppe 6) 2	4
Total	6		6	12

Tabelle 2: Design des ersten Pilotstudienteils

	Systemische Antibiose mit Ceftriaxon 50 mg/kg Körpergewicht s.c.			
	kein rhBMP-2		200 µg rhBMP-2 Konzentration: 2 mg/ml	Total
10 ³ KBE <i>S.aureus</i>	(Gruppe 7)	2	(Gruppe 8) 2	4
10 ⁵ KBE <i>S.aureus</i>	(Gruppe 9)	2	(Gruppe 10) 2	4
Total	4		4	8

Tabelle 3: Design des zweiten Pilotstudienteils

In der Hauptstudie sind die Effekte von rhBMP-2 in Kombination mit einer Ceftriaxon-Antibiose durch eine Versuchsgruppe mit rhBMP-2 Applikation und einer Kontrollgruppe ohne rhBMP-2 Applikation untersucht worden (Tab. 4).

	10 ⁴ KBE <i>S. aureus</i> Ceftriaxon 50 mg/kg Körpergewicht s.c.	Total
200 µg rhBMP-2 Konzentration: 2 mg/ml	11	22
Kein rhBMP-2	11	

Tabelle 4: Hauptstudiendesign

2.2.2 Operationstechnik

Die Operationen (Abb. 7a, b) wurden unter sterilen Bedingungen in Allgemeinnarkose (Ketamin (60 mg/kg KG), Xylazin (6 mg/kg KG), Atropin (0,1 mg/kg KG)) durchgeführt. Zunächst wurde der rechte Unterschenkel rasiert, enthaart und mit Povidon-Iodlösung (10%ig) desinfiziert. Anschließend wurde das Operationsfeld am linken Unterschenkel im mittleren Schaftbereich mit einem Lochtuch steril abgedeckt.

Dann wurde der distale Diaphysenbereich des Margo anterior tibiae mit einem Einwegskalpell der Größe 11 inzidiert. Mit dem Skalpell wurde entlang der Facies medialis et lateralis tibiae entlang präpariert, so dass auf der Dorsalseite mit einer Overholt-Klemme stumpf präpariert werden konnte. Die Overholt-Klemme befand sich zwischen Facies posterior tibiae und Compartmentum posterius sowie Compartmentum anterius cruris. Die Inzision wurde bei liegender Overholt-Klemme bis zur Tuberositas tibiae fortgeführt. Dies ermöglichte die transpatelläre Eröffnung des Canalis medullaris tibiae mit der Skalpellspitze. Über die eröffnete Tuberositas tibiae wurde als intramedulläres Implantat eine 21 G Kanüle (0,8 mm Außendurchmesser) in den Markkanal eingeführt. Senkrecht zur Tibialängsachse wurde mittels oszillierender Säge oberhalb der Overholt- Klemme mit der Osteotomie begonnen. Dann wurde die Kanüle ein Stück zurückgezogen und die Osteotomie vollendet, so dass die Tibia vollständig durchtrennt war. Daraufhin wurde die entstandene Osteotomie durch erneutes Verschieben der Kanüle achsgerecht reponiert. Die Kanüle musste dabei im distalen Knochenmarkkanal platziert und verklemmt sein. Die digitale Prüfung der Rotationsstabilität gab Hinweis auf ein korrektes Repositionsergebnis. Die Frakturstelle wurde daraufhin dorsolateral mit der entsprechenden Bakterienkonzentration kontaminiert. Die Kanülenöffnung zeigte dabei in Richtung Frakturspalt. Das inokulierte Volumen betrug unabhängig von der eingesetzten Bakterienkonzentration stets 20 µl. Zur Kontrolle der korrekten Inokulationsdosis wurden von der verbliebenen Suspension aus der Spritze 20 µl auf eine BHI-Agarplatte pipettiert und mit dem Drigalskispatel ausplattiert. Der mit einer Schere zurechtgeschnittene absorbierbare Kollagenschwamm (ACS) mit den Maßen 1cm x 1cm x 0,35 cm ergab ein Implantationsvolumen von 0,35 ml und wurde mit einer 1 ml Spritze mit 175 µg oder 200 µg rhBMP-2 entsprechend einer Konzentration von 1,75 respektive 2 mg/ml versetzt (Abb. 6). Die Applikation wurde von ventral vorgenommen. Ohne größere Krafteinwirkung wurde der Schwamm nach dorsal dem Verlauf des Osteotomiespaltes angepasst, um ein Herauspressen der rhBMP-2- Lösung aus dem Kollagenschwamm zu vermeiden. In den jeweiligen Kontrollgruppen entfiel dieser Arbeitsschritt.

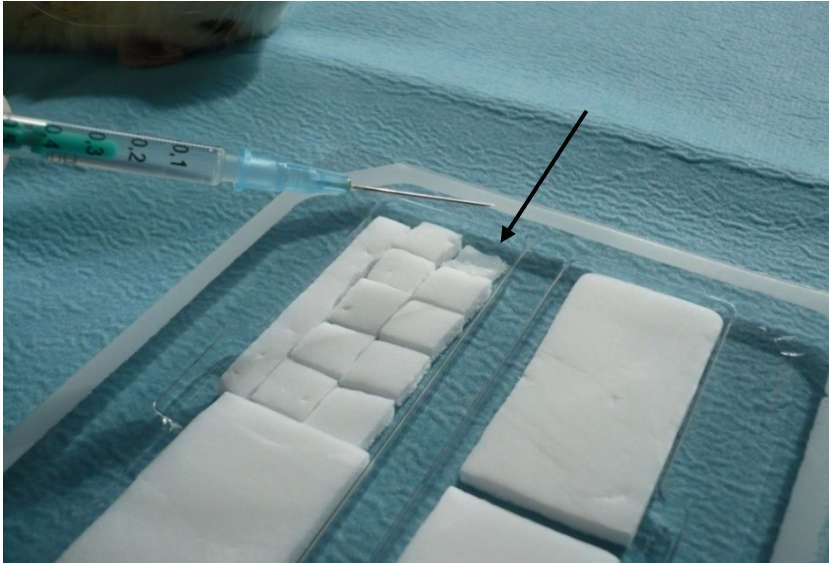


Abbildung 6: Präparation des zurechtgeschnittenen Kollagenschwammes. RhBMP-2- Lösung in der 1 ml Spritze und mit rhBMP-2- Lösung versetzter Schwamm (Pfeil).

Der Subkutanverschluss erfolgte mit 4-0 Vicrylfaden. Die über die Tuberositas tibiae hinausragende Kanüle wurde wenige Millimeter zurückgezogen, abgetrennt und das noch überstehende Ende in den Markkanal hineingedrückt und versenkt. Im folgenden Arbeitsschritt wurde die Haut mit 4-0 Prolenefaden in Einzelknopftechnik verschlossen, die Naht mit Hautklammern gesichert und mit Sprühpflaster abgedeckt. Die Dauer des operativen Eingriffs betrug etwa 20 Minuten. Nach Beendigung der Operation wurden die Tiere im Käfig in Bauch- Brustlage gebracht und bis zum Abklingen der Narkotika unter Wärmelampen gehalten. Eine seitliche Röntgenaufnahme diente zur Überprüfung der Osteosynthese. Als postoperative Schmerzmedikation wurde Carprofen (0,4 mg/kg KG s.c.) für fünf Tage gegeben. Die Tiere der Hauptstudie als auch einige Tiere der Pilotstudie erhielten gemäß Studienprotokoll Ceftriaxon (50 mg/kg KG s.c.) für 14 Tage. Futter und Wasser stand weiterhin ad libitum zur Verfügung. Gewicht, Temperatur, Wundverhältnisse und Belastung der Extremität wurden für den gewählten Beobachtungszeitraum von sechs Wochen täglich von einer Veterinärmedizinerin kontrolliert. Die Euthanasie erfolgte nach sechs Wochen. Die Implantate und Tibiae wurden dabei unter sterilen Bedingungen entfernt.

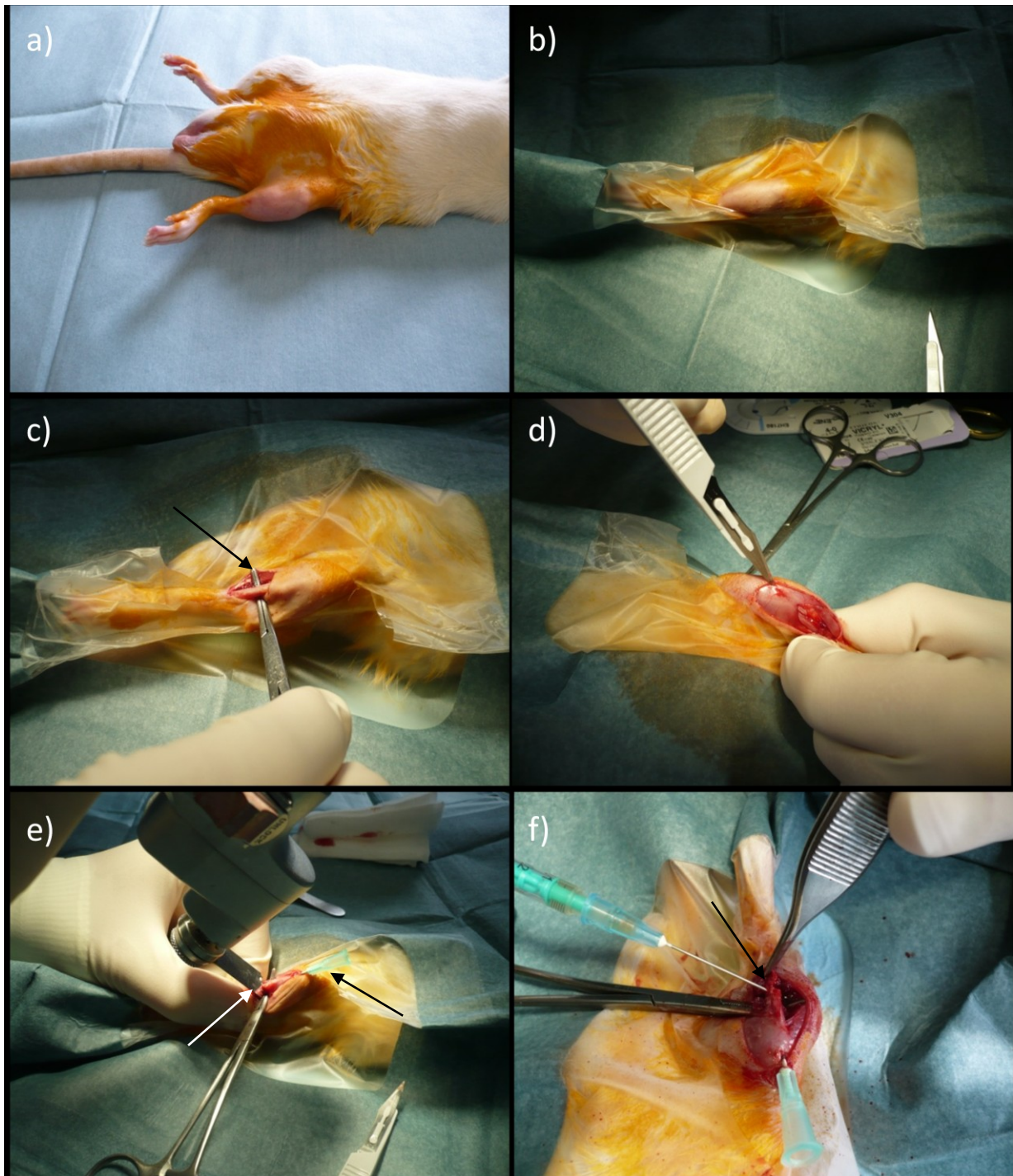


Abbildung 7a: Operationstechnik. Versuchstier präoperativ in Rückenlage. Linker Unterschenkel enthaart und mit Povidon-Iodlösung (10%ig) desinfiziert (a). Mit einem Lochtuch steril abgedecktes Operationsfeld mit Aussparung des Tibiaschaftbereiches (b). Nach Inzision entlang der Tibiavorderkante und Präparation der Unterschenkelflexoren wird eine Overholt- Klemme (Pfeil in c) als Widerlager für die Osteotomie zwischen dorsaler Tibia und präparierter Flexoren stumpfeingeschoben (c). Mit einem Skalpell wird der Markraum transpatellär durch die Patellasehne eröffnet (d). Dann wird bei intramedullär einliegender Kanüle, die als intramedulläres Implantat (schwarzer Pfeil in e) verwendet wird, die Tibia mit einer oszillierenden Säge im Tibiaschaftbereich (weißer Pfeil in e) osteotomiert (e). Nach erfolgter Osteotomie wird die Inokulationsdosis mit einer 1 ml Spritze direkt in den Osteotomiespalt injiziert (Pfeil in f).

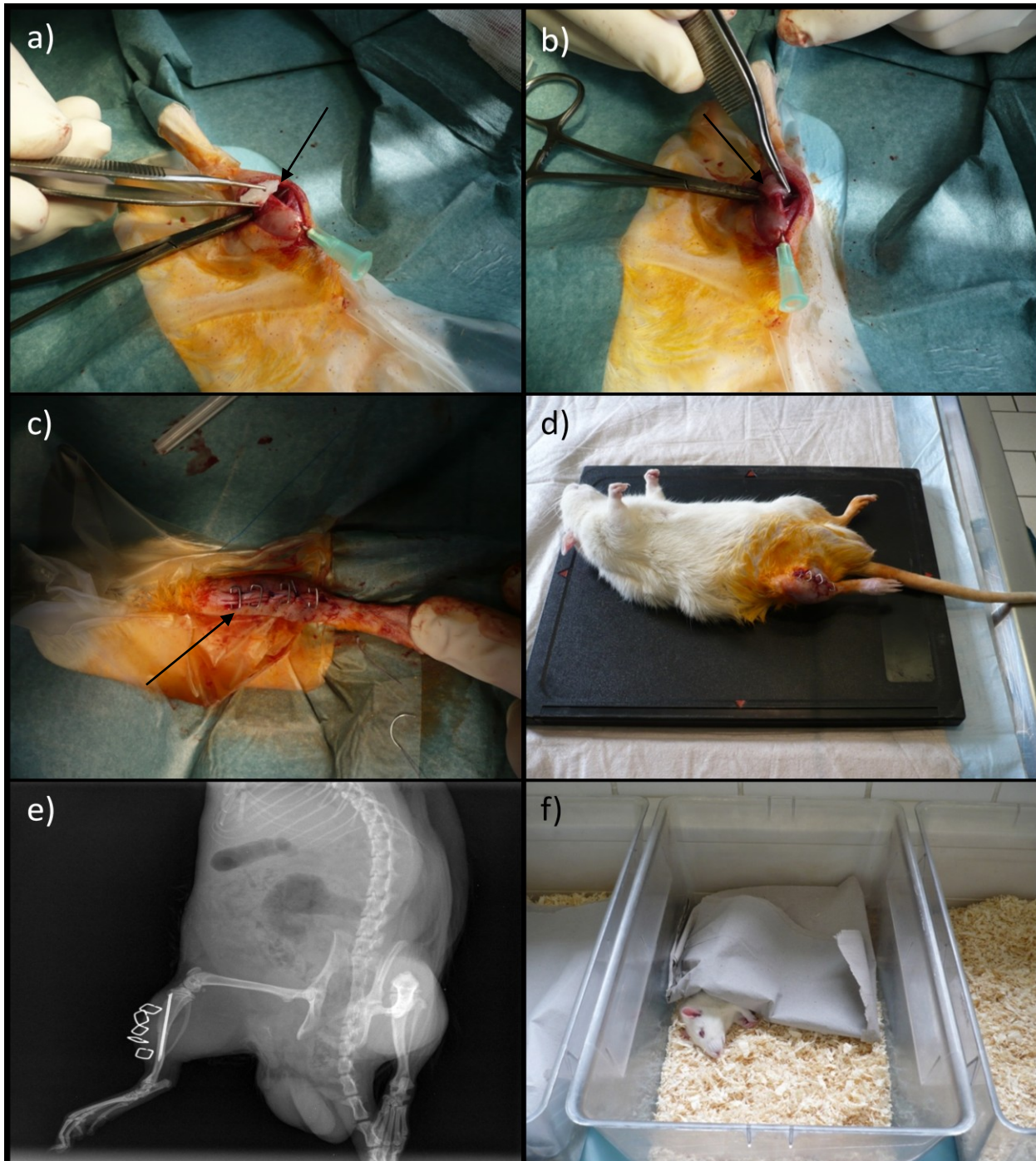


Abbildung 7b: Operationstechnik. Der mit rhBMP-2- Lösung versetzte kollagene Schwamm (Pfeil in a) wird zunächst auf die Vorderkante im Bereich der Tibiaosteotomie aufgebracht (a) und dann um den Tibiaschaft herumgewickelt (Pfeil in b). Anschließend erfolgt der schichtweise Wundverschluss inklusive Hautnaht, die durch Hautklammern (Pfeil in c) zusätzlich vorm Benagen gesichert wurde (c). Anschließend wird das operierte Tier auf eine Röntgenkassette gelegt (d) und ein postoperatives Röntgenbild zur Lagekontrolle des intramedullären Implantates angefertigt (e). Dann wird das Tier im Makrolonkäfig mit Zellstoff bedeckt um es vor dem Auskühlen zu schützen (f) und bis zum Abklingen der Narkotika unter Wärmelampen gehalten (hier nicht gezeigt).

2.2.3 Postoperatives Röntgen

Eine Röntgenaufnahme im seitlichen Strahlengang bestätigte postoperativ die korrekte Positionierung des eingebrachten intramedullären Implantates (Abb. 8). Dazu wurde das noch narkotisierte Tier am Ende der Operation in Seitenlage auf eine Röntgenkassette gelegt (Abb. 7i). Mit einem portablen Hochfrequenz- Röntgengerät (Gierth HF 300™, Gierth X-Ray International GmbH, Riesa) wurden, bei einer Spannung von 70 Kilovolt (kV) und einem Abstand von 30 cm zwischen Röntgenkassette und Röntgengerät, die Aufnahmen angefertigt. Das Röntgengerät war an einem Stativarm befestigt, so dass der Abstand zum Tier konstant war und mit Hilfe der integrierten Laserzielvorrichtung die Zentrierung der Aufnahme auf den mittleren Tibiaschaftbereich erfolgte. Nach Anfertigung der Aufnahme wurde der belichtete Röntgenfilm digitalisiert und die Aufnahme ob der korrekten Lage des intramedullären Implantates befundet.

Im Raum anwesende Personen trugen die arbeitsrechtlich vorgeschriebenen Röntgenschutzwesten und Dosimeter.

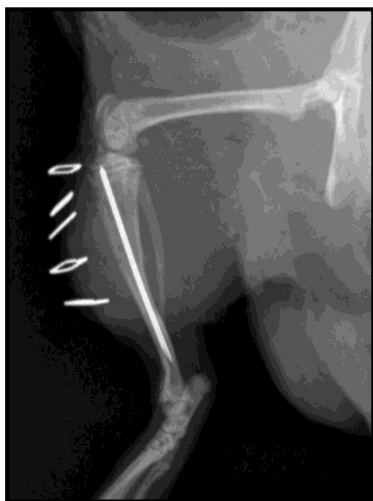


Abbildung 8: Postoperative seitliche Röntgenaufnahme mit korrekter Platzierung des intramedullären Implantates nach Osteotomie im mittleren Tibiaschaftbereich.

2.2.4 Beurteilung von Infektion und Knochenheilung

Der Infektionsstatus und die Knochenheilung wurden anhand folgender Methoden beurteilt:

- tägliche Gewichtskontrolle
- klinische Begutachtung der Wunde und Frakturstabilität
- Bildgebung
 - Konventionelles Röntgen

- Micro-CT (μ CT)
 - Rasterelektronenmikroskopie (REM)
- Mikrobiologie
 - Ausrollen der Kirschner-Drähte (K-Draht)
 - Dilutionsreihen von Knochenproben der Tibiae
- biomechanische Testung

2.2.5 Körpergewichtsentwicklung

Die Gewichtskontrolle erfolgte erstmals unmittelbar präoperativ und wurde bis zum Ende des Beobachtungszeitraums täglich mit einer geeichten Federzugwaage (Federzugwaage 2500g Medio-Line®, PCE Deutschland GmbH, Meschede) durchgeführt. In der Hauptstudie wurde ein möglicher Effekt von rhBMP-2 auf den Gesamtzustand der Tiere über eine verbesserte Knochenbruchheilung auf die Körpergewichtsentwicklung durch eine Varianzanalyse, mit Signifikanzniveau $p < 0,05$, analysiert. Die Mittelwerte von Versuchs- und Kontrollgruppe, unmittelbar präoperativ und von Tag 7, 14, 21 und Tag 42 (Messzeitpunkte 1-5), wurden miteinander verglichen.

2.2.6 Klinische Begutachtung der Wunde und Frakturstabilität

Als klinische Zeichen einer Infektion wurden Rötung und Schwellung der Weichteile, Abszessformationen, Fisteln und Eiterdrainage gewertet. Nach der Tibiaspaltung zur Gewinnung knöchernen Materials für die Dilutionsreihen wurde der Markkanal auf Eiter, Lyse der Kortikalis und Beteiligung des Knie- oder Sprunggelenkes untersucht. Durch manuelle Torquierung der Fraktarenden gegeneinander wurde die Frakturstabilität überprüft. Jegliche Beweglichkeit der distalen Tibia gegen die proximale Tibia wurde als Frakturinstabilität mit insuffizienter knöcherner Osteotomiespaltüberbrückung bewertet.

2.2.7 Bildgebung

Vor Explantation der K- Drähte wurde die operierte Extremität in zwei Ebenen (Abb. 9) geröntgt (a.-p. und seitlich). Die Aufnahmen wurden analog zu den postoperativen Röntgenbildern bei einer Spannung von 70 kV und einem Abstand von 30 cm zwischen Röntgenkassette und portablen Röntgengerät (Gierth HF 300™, Gierth X-Ray International GmbH, Riesa) angefertigt und anschließend digitalisiert.

Als radiologische Zeichen für eine Knocheninfektion wurden Gelenk- und Knochendestruktionen, Knochensequester, Knochensequesterformationen, Lyse der Kortikalis und periostale Verdickung gewertet.

Die Überbrückung von mindestens drei von vier Cortices auf Grundlage der seitlichen und anterioren- posterioren Aufnahme (Abb. 9) wurde analog zur BESST- Studie (BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma; Govender et al., 2002) als erfolgreiche Frakturheilung und bei weniger als drei überbrückten Cortices als Pseudarthrose definiert.

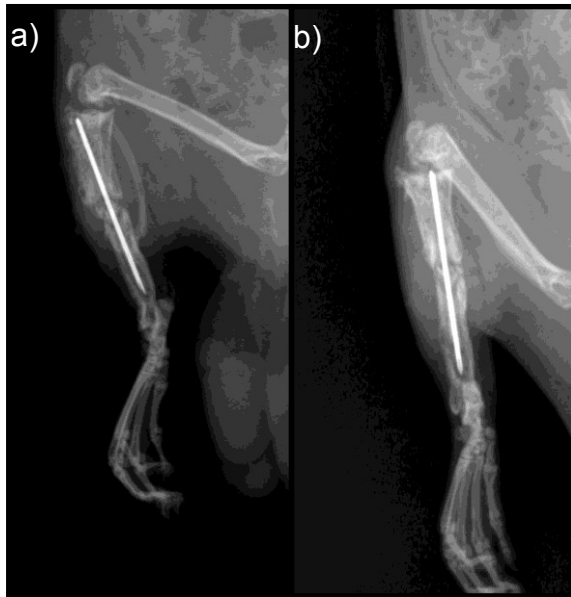


Abbildung 9: Seitliche (a) und a.-p.- Röntgenaufnahme (b)

Die Osteotomie von sieben zufällig ausgewählten Tieren aus jeder Gruppe der Hauptstudie wurden zusätzlich im Institut für Biomechanik der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau mikrocomputertomographisch (μ CT 80, Scanco Medical AG, Bassersdorf, Schweiz) gescannt. Zur Fixation wurde die explantierte und per Skalpell von muskuloligamentärem Gewebe vollständig befreite Tibia in einen einseitig eingeschnittenen Schaumstoffblock hineingedrückt und in eine mit physiologischer NaCl- Lösung (0,9%) gefüllte Micro-CT-Röhre verbracht. Über einen gekerbten Dorn wurde das Behältnis im Micro-CT starr befestigt (Abb. 10). Mit einem Übersichtsscan wurde zunächst der Osteotomiespalt lokalisiert und digital markiert. Von dort aus wurden mit einer Integrationszeit von 400 Millisekunden (ms) jeweils 200 Schichten à 36 Mikrometer (μ m) nach proximal und distal gemacht. Somit ergab sich eine gescannte Gesamtstrecke von 1,44 cm. Ausgehend von der im Übersichtsscan markierten Osteotomie ergaben sich so jeweils 0,72 cm nach distal und kaudal. Knochendestruktionen, kortikale Lyse, periostale Auftreibungen und Sequesterbildung waren Kriterien für eine infizierte Pseudarthrose. In Analogie zu den Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen wurde eine Überbrückung von mehr als 75 % des initialen Osteotomiespaltes als

erfolgreiche Knochenheilung definiert. Darüber hinaus wurden die Quotienten aus kalifiziertem Knochenvolumen (bone volume= BV) zu Gesamtvolumen des gescannten Knochens (tissue volumen= TV) der Versuchstiere beider Gruppen mit einem t-Test ($p < 0,05$) verglichen.

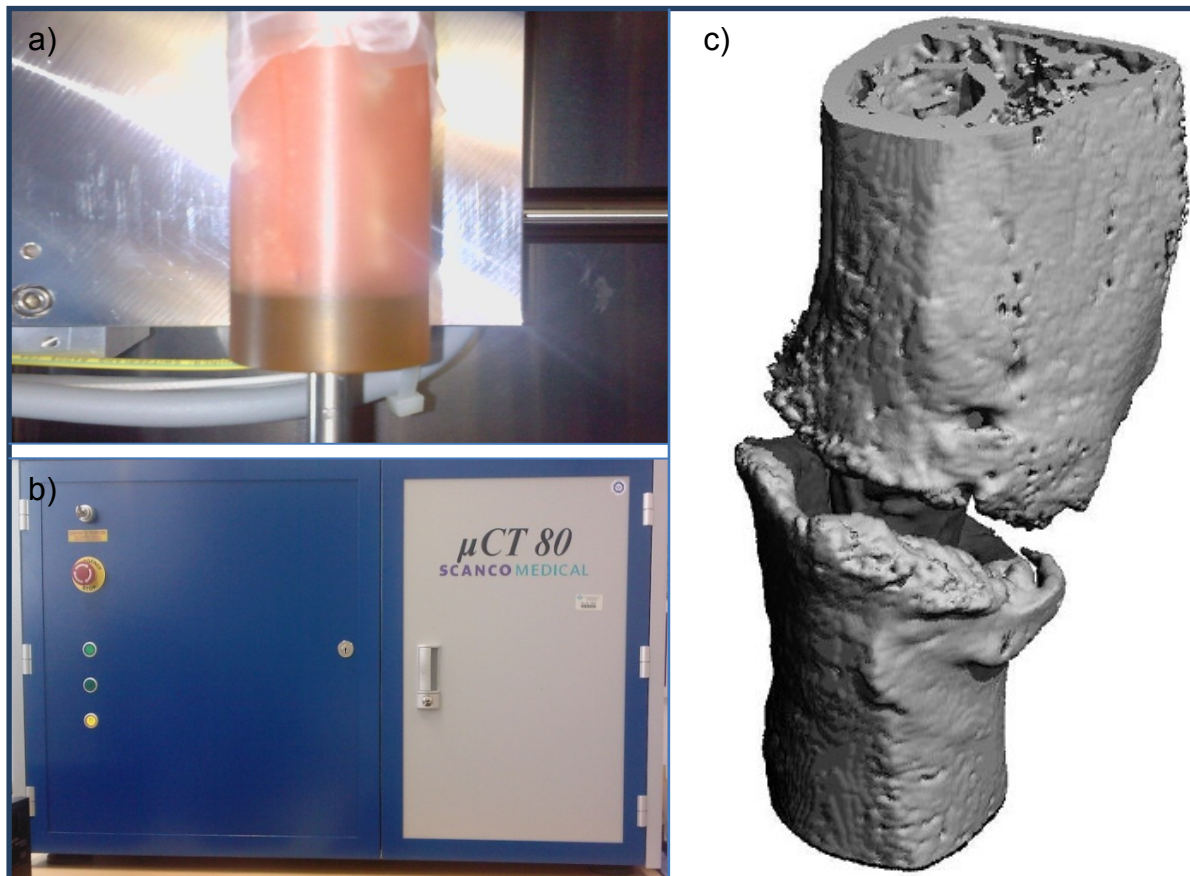


Abbildung 10: Tibia in µCT- Behältnis (a), µCT in Betrieb (b) und vollständiger Scan (c).

2.2.8 Mikrobiologie

Die unter sterilen Bedingungen explantierten K- Drähte wurden auf BHI-Agarplatten ausgerollt (Abb.11 (b)). Positives Koloniewachstum als Zeichen einer Kolonisierung des K- Drahtes wurde als Infektion interpretiert.

Die exartikulierten Tibiae der Pilotstudie und vier zufällig ausgewählte Tibiae pro Gruppe in der Hauptstudie wurden mit einer oszillierenden Säge median in zwei Hälften gespalten. Die mediale Hälfte wurde der histologischen Aufbereitung zugeführt. Zur Bestimmung der Bakterienlast in koloniebildenden Einheiten pro Gramm Knochen (KBE/g Knochen) wurde die laterale Hälfte gewogen. Um ein Knochenhomogenisat zu erhalten wurde sie, wie von Alt

et al., (2006) publiziert, in ein mit 10 ml PBS- Puffer gefülltes Dispergiergefäß gebracht und in einer Gewebsmühle (Tissue Grinder Polytron 2100, Kinematica AG, Littau, Schweiz) in 2 verschiedenen Geschwindigkeiten für insgesamt 5 Minuten zermahlen. Dazu wurde der Knochen zunächst drei Minuten bei 2000 und dann zwei Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute vollständig zermahlen (Abb. 11 (a)). Diesem Homogenisat wurden 300 µl entnommen und in ein 1,5 ml Röhrchen gegeben. Dies entspricht der Verdünnung 0. Von der Verdünnung 0 wurden 100 µl in ein mit 900 µl PBS- Puffer gefülltes Röhrchen überführt. Somit entstand eine 1:10 Verdünnung (10^{-1} = Verdünnung 1). Auf demselben Weg wurde eine 10^{-2} (Verdünnung 2) und 10^{-3} (Verdünnung 3) hergestellt. Von der jeweiligen Verdünnung wurden also jeweils 100 µl entnommen und zu 900 µl PBS- Puffer hinzupipettiert. Aus jeder Verdünnung wurden 25 µl auf eine Agarplatte pipettiert und per Drigalskispatel ausplattiert (Abb. 11 (c)). Die Agarplatten wurden für 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Die Anzahl KBE/g Knochen wurde für jede Verdünnung durch Auszählen der gewachsenen Kulturen und Multiplikation mit dem Kehrwert der jeweiligen Verdünnung und anschließender Division durch das Gewicht der verwendeten Tibiahälfte ermittelt. Das arithmetische Mittel der Verdünnungen ergibt die Bakterienlast der Tibia als Anzahl der KBE/g Knochen des Versuchstieres. Ein t-Test für logarithmisch transformierte Daten wurde zum Vergleich zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe angewandt. Statistische Signifikanz bestand bei p-Werten geringer 0,05 ($p < 0,05$).

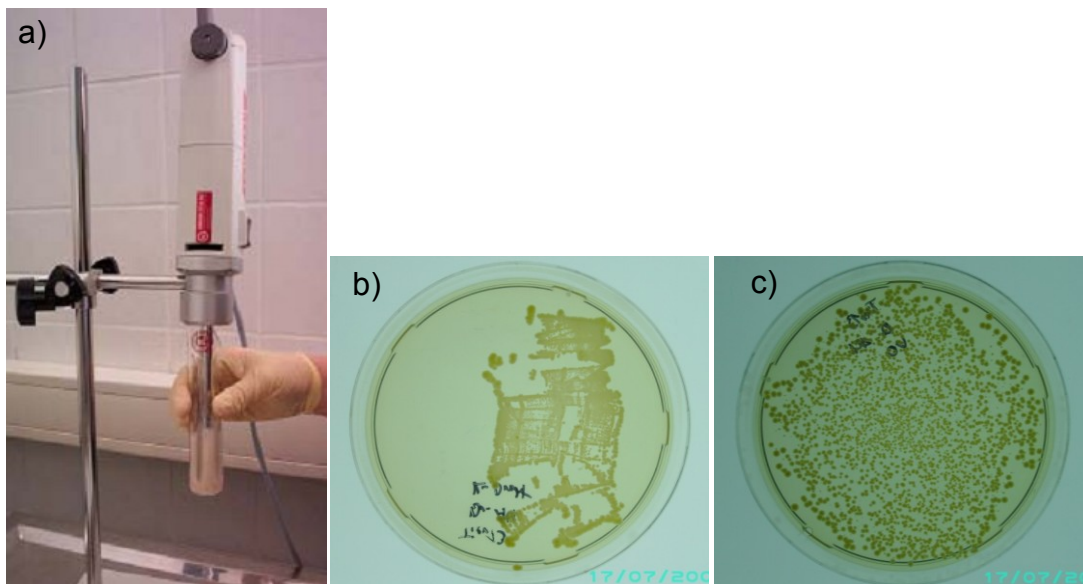


Abbildung 11: Herstellung des Homogenisates durch Zermahlen der Knochenproben (a), positives Kulturenwachstum eines auf einer BHI-Agarplatte ausgerollten K-Drahtes (b) und Beispiel einer ausplattierten Verdünnung mit positivem Bakterienwachstum auf der gesamten BHI-Agarplatte (c).

2.2.9 Rasterelektronenmikroskopie

Die Bilder der Rasterelektronenmikroskopie (Leo 1530, LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen) wurden im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Gießen angefertigt. Nach dem Ausrollen auf BHI-Agarplatten wurden die explantierten K-Drähte für 48 Stunden mit 4%iger Saccharase-Lösung behandelt um eventuelle BHI-Agarreste auf den K-Drähten zu hydrolysieren. Anschließend wurden sie für vier bis acht Wochen luftgetrocknet. Mit einer sterilen Drahtschneidezange wurde jedes Implantat in drei Stücke, von identischer Länge, geschnitten. Die drei Teile eines K-Drahtes wurden gemeinsam auf einem selbstklebenden Stiftprobenhalter fixiert und mit einer Gold-/Palladiumschicht zur Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit überzogen (SC 7640 Sputter Coater, VG Microtech, Uckfield, Großbritannien). In Abhängigkeit von der gewünschten Auflösung wurden 7,5 Kilovolt (kV) oder 15 kV als Betriebsspannung gewählt (Abb. 12).

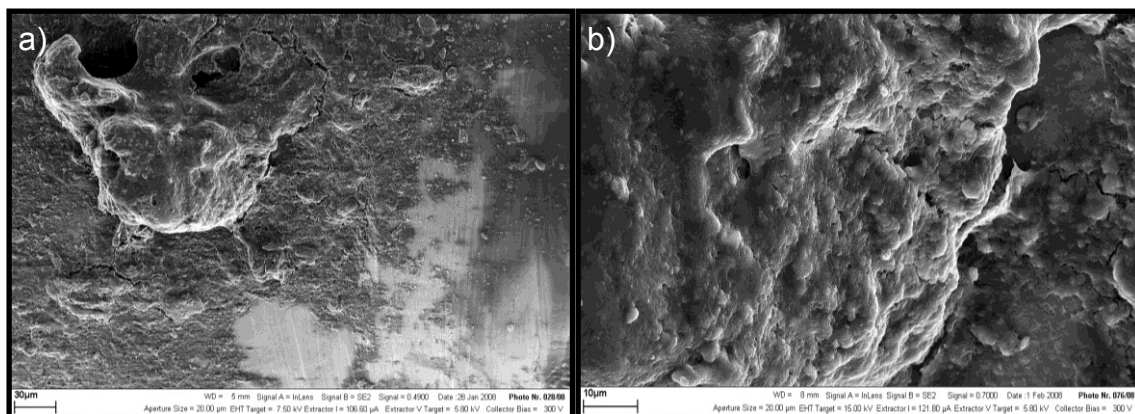


Abbildung 12: Rasterelektronenmikroskopie eines K-Drahtes zeigt in Biofilm eingebettete kokkoide Formationen bei 7,5 kV (a) und 15 kV (b).

2.2.10 Biomechanik

Die biomechanische Testung wurde im Institut für Biomechanik der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau durchgeführt. Die zu testenden Tibiae wurden zunächst mit einem Skalpell vollständig von Sehnen und inserierendem Muskelgewebe befreit. Um eine mögliche Beeinflussung der Messung zu verhindern, wurde zusätzlich das Periost vollständig abpräpariert und die Fibula mit einer Zange von der distalen Tibia abgetrennt. In einer vom Institut für Biomechanik der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau eigens hergestellten Halterung für Knochen mit einer Länge von bis zu 7,5 cm wurde das proximale und distale Ende der zu testenden

Tibia in Technovit 3040® (Heraeus Kulzer, Wehrheim) eingebettet. Eine servohydraulische Testmaschine (Instron 8874, Instron Limited, High Wycombe, Großbritannien) torquierte im Uhrzeigersinn mit einer Geschwindigkeit von einem Grad pro Sekunde ($^{\circ}/s$) die proximale gegen die distale Tibia. Die Messung wurde bis zum vollständigen Versagen des Knochens fortgeführt (Abb. 13). In einigen Fällen war auf Grund der ausgeprägten Knocheninstabilität die Einbettung nicht möglich, so dass das minimal detektierbare Drehmoment von 0,01 Newtonmeter (Nm) angenommen werden musste. Zur statistischen Auswertung wurde als nichtparametrisches Äquivalent zum t-Test ein Mann-Whitney- Test ($p < 0,05$) verwendet.

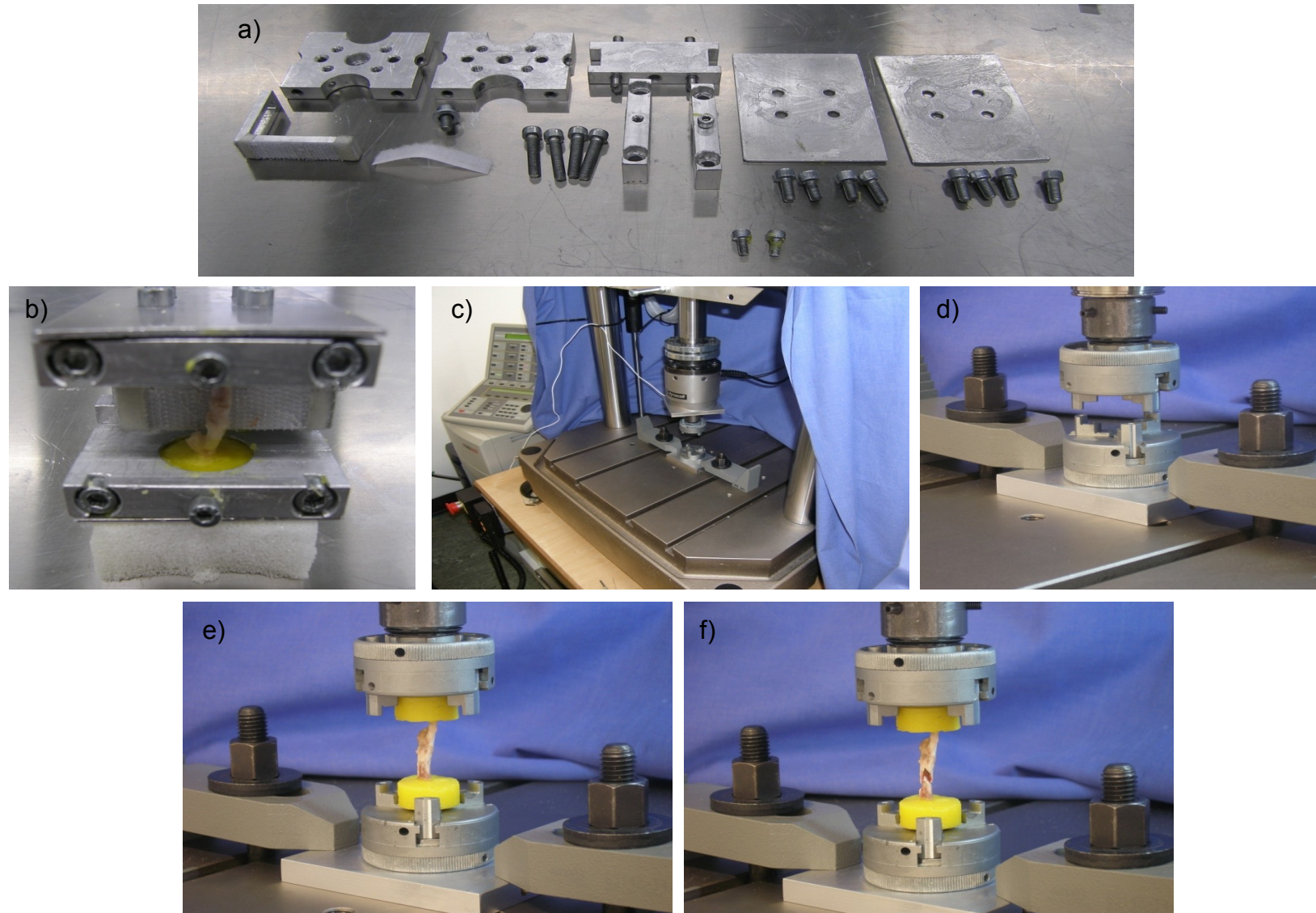


Abbildung 13: Bestandteile der Halterung vor Montage (a). Vollständig eingebettete Tibia in Knochenhalterung (b). Testmaschine (c) mit montierter Kraftmessdose (d) und eingespannter Tibia vor (e) und nach biomechanischer Testung (f).

3 Resultate

3.1 Ergebnisse der 1. Pilotstudie

Alle Versuchstiere überlebten ohne Anzeichen einer systemischen Infektion den postoperativen Beobachtungszeitraum von sechs Wochen. Die gewählten Inokulationsdosen erzeugten nach genannten klinischen, radiologischen und mikrobiologischen Kriterien zu 100% eine in klinischer Manifestation variierende Weichteil- und Knocheninfektion (Abb. 14). Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsverfahren korrelierten zu 100%. Je höher die Anzahl inokulierter Bakterien, desto ausgeprägter waren die Knochendestruktionen und die eitrigen Subkutaninfektionen. Eine Inokulationsdosis von 10^7 (Gruppe 5+6) führte nach Ausrollen der explantierten K-Drähte auf Agarplatten zu vollständig konfluierendem Wachstum, so dass weder eine maschinelle noch manuelle Auszählung möglich war. Klinisch als auch radiologisch präsentierten sich diese Tiere im Vergleich zu Versuchstieren mit 10^3 (Gruppe 1+2) oder 10^5 (Gruppe 3+4) KBE als Inokulationsdosis nahezu identisch, so dass auf Grund mangelnder Auswertbarkeit und geringem Zuwachs interpretierbarer Ergebnisse im zweiten Abschnitt (Gruppen 7-10) der Pilotstudie auf Versuchsgruppen mit einer Keimdosis von 10^7 verzichtet wurde. Zudem wurden auf Grund geringer klinischer, radiologischer und mikrobiologischer Differenzen von Kontrollgruppen (Gruppen 1-3) zu Versuchsgruppen (Gruppen 4-6) – in Analogie zu anderen tierexperimentellen Studien infizierter segmentaler Defekte langer Röhrenknochen (Chen et al., 2006 und 2007) – die Dosis von rhBMP-2 von 175 µg auf 200 µg erhöht. Dies entspricht einer Konzentrationssteigerung um 12,5% von 1,75 mg/ml auf 2 mg/ml.

3.2 Ergebnisse der 2. Pilotstudie

Alle Tiere überlebten ohne Komplikationen oder Anzeichen einer systemischen Infektion den postoperativen Beobachtungszeitraum von sechs Wochen. Unter prolongierter Antibiotikaphylaxe (Ceftriaxon 50mg/kg Körpergewicht s.c. für 14 Tage) betrug die Rate infizierter Pseudarthrosen bei 10^3 KBE in der Kontrollgruppe (Gruppe 7) 50% und 0% in der Versuchsgruppe (Gruppe 8) mit zusätzlicher Applikation von 200 µg rhBMP-2, in einer Konzentration von 2 mg/ml. Die Verwendung von 10^5 KBE als Inokulationsdosis führte unter rhBMP-2-Anwendung zu 100% (Gruppe 10) und

zu 50% in der Kontrollgruppe (Gruppe 9) zu einer infizierten Tibiapseudarthrose (Tab. 5).

Infizierte Pseudarthrosen	Kontrolle		200 µg rhBMP-2 (Konz.: 2 mg/ml)		Total
10^3 KBE	(Gruppe 7)	1/2	(Gruppe 8)	0/2	1/4
10^5 KBE	(Gruppe 9)	1/2	(Gruppe 10)	2/2	3/4

Tabelle 5: Ergebnis der 2. Pilotstudie

3.2.1 klinische Beurteilung

Tiere mit Anzeichen für eine infizierte Pseudarthrose wiesen als Zeichen einer Weichteil- und Knocheninfektion prätibiale Schwellungen, lokale Gewebseinschmelzungen und zum Teil fistulierende subkutane Eiterformationen auf (Abb. 14).

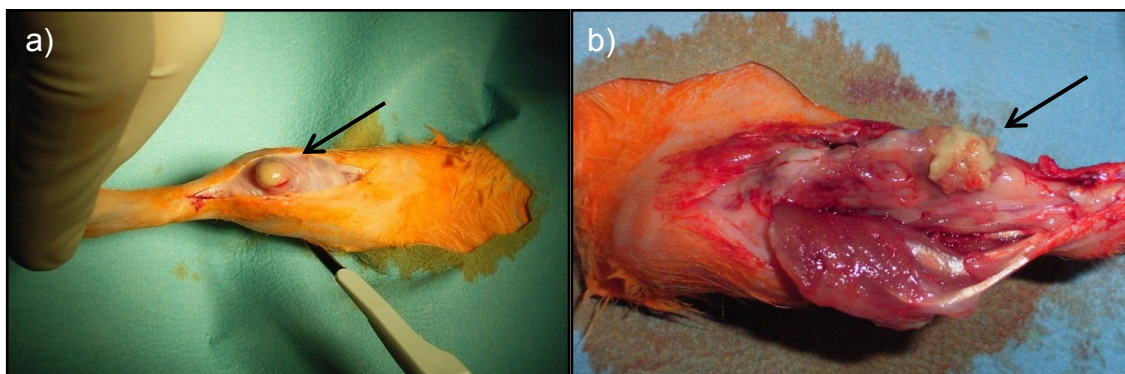


Abbildung 14: Beurteilung der Knochen- und Weichteilinfektion bei einem Versuchstier mit 10^5 KBE (a) und 10^7 KBE (b). Beide Tiere präsentierten eine deutliche Knochen- und Weichteilinfektion mit Eiterbildung (Pfeil in Bild a und b).

3.2.2 Röntgendiagnostik

Die konventionell radiologische Diagnostik bestätigte ausnahmslos die klinisch erhobenen Befunde. Fehlende kortikale Überbrückung des Osteotomiespaltes, Knochensequester, kortikale Lyse und Periostverdickungen zeichneten die chronische Osteitis aus. Intramedulläre Implantate infizierter Tiere wiesen diaphysär im Bereich des Defektes aufgrund der persistierenden Instabilität Verformungen auf (Abb. 15 c, d). Die für infektionsfrei befundenen Tiere imponierten ohne Anhalt für Zeichen einer

Knocheninfektion mit der vollständigen Überbrückung der vier Tibiacortices und Osteointegration des K-Drahtes (Abb. 15 a, b).

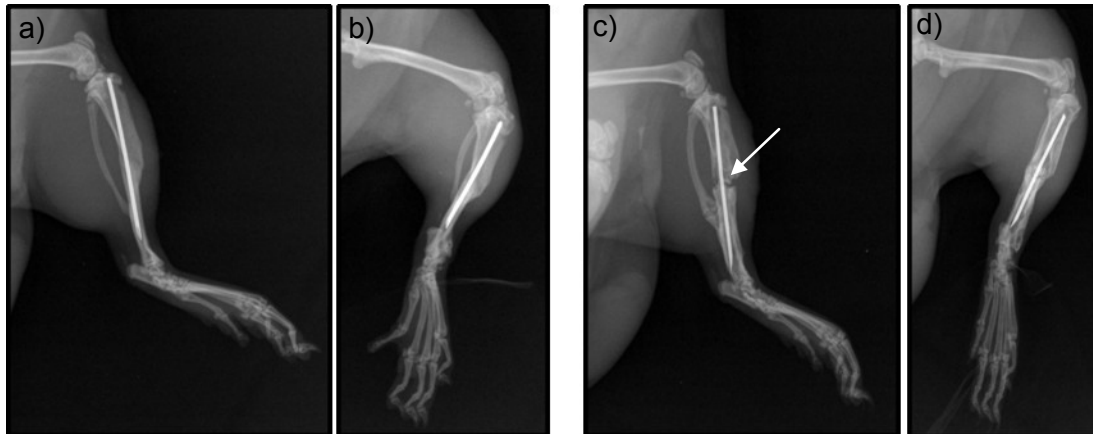


Abbildung 15: Erfolgreiche Überbrückung von vier Cortices in der lateralen (a) und a.-p.- Aufnahme nach 42 Tagen bei einer Inokulationsdosis von 10^3 KBE (b). Im Vergleich eine diaphysäre infizierte Tibiaschaftpseudarthrose bei 10^5 KBE mit Bildung eines Knochensequesters (Pfeil in c) ohne Anzeichen einer kortikalen Überbrückung in der lateralen (c) und a.-p.- Aufnahme (d).

3.2.3 Mikrobiologische Auswertung

Die mikrobiologische Auswertung der infizierten Tiere ergab annäherungsweise 10^4 KBE auf den Agarplatten der ausgerollten K-Drähte. Die Verteilung der Kolonien legte nicht nur die Besiedelung im Bereich der Frakturzone, sondern die Kolonisierung über die gesamte Länge des Implantates nahe. Die K-Drähte der infektionsfreien Tiere blieben steril (Abb. 16). Die Verdünnungsreihen aus den zermahlenden Knochenproben ergaben, unabhängig ob 10^3 oder 10^5 KBE zur Inokulation verwendet wurden, durchschnittlich 10^5 KBE/g Knochen.

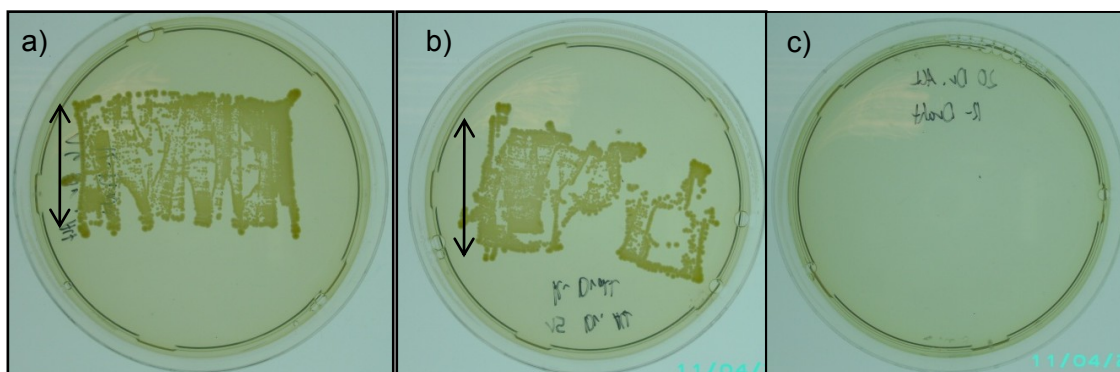


Abbildung 16: Beispiele für bebrütete Agarplatten nach Ausrollen der K-Drähte. Homogene Kolonisierung der Implantate, erkennbar am positiven Kulturwachstum über die gesamte Länge des ausgerollten Implantates (Pfeile) bei 10^3 KBE (a) und 10^5 KBE (b) als Inokulationsdosis. Kein Kulturenwachstum auf der Agarplatte bei einem infektionsfreien Tier (c).

3.2.4 Rasterelektronenmikroskopie

In der Rasterelektronenmikroskopie fielen die klinisch infizierten Versuchstiere durch Anhäufungen kokkoider Bakterien, eingebettet oder unter einer Schicht extrazellulärer Matrix verborgen, auf. Diese Schicht an extrazellulärer Matrix wurde als Biofilm bakteriellen Ursprungs bewertet (Abb. 17). Die explantierten Implantate nicht infizierter Tiere waren frei von Biofilmformationen.

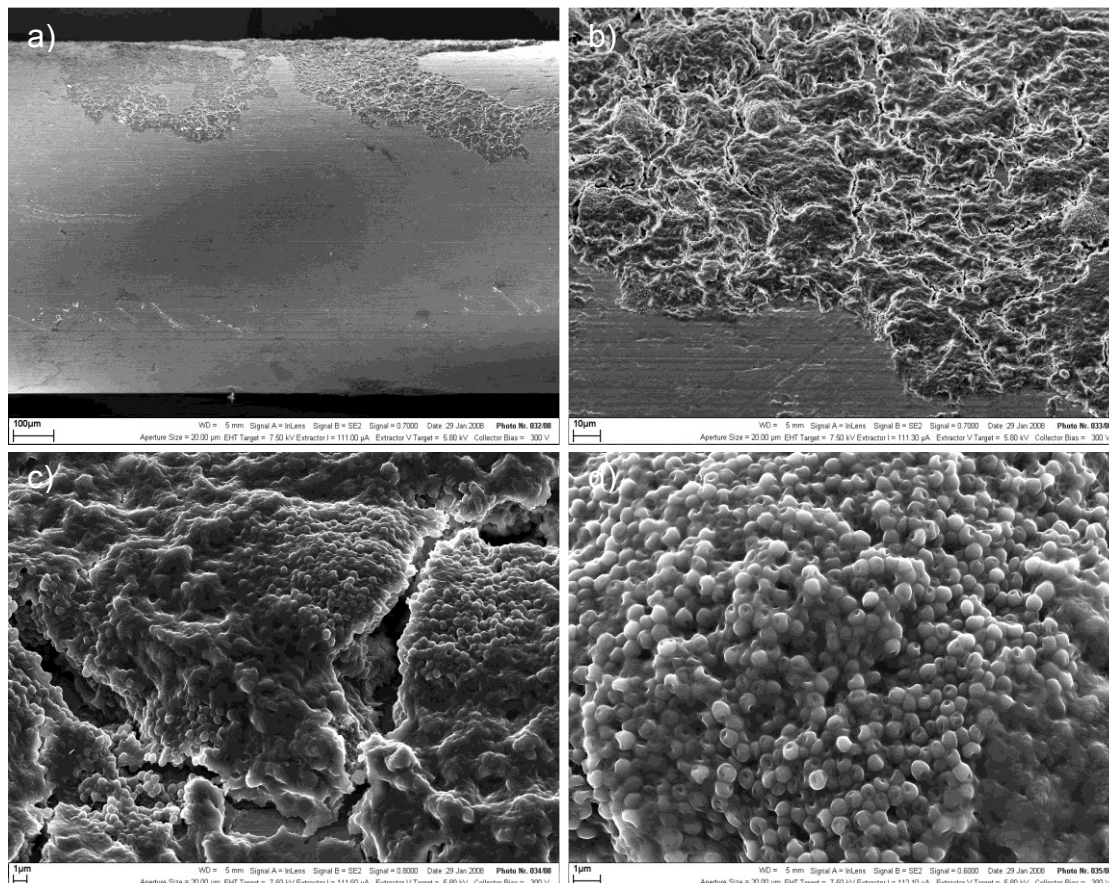


Abbildung 17: K-Draht eines infizierten Tieres mit 10^5 KBE. Auffälliger recht scharf begrenzter Film (a, b), der mit zunehmender Vergrößerung Bakterienformationen (c) erkennen lässt, bis einzelne kokkoide Bakterien (d) voneinander abgegrenzt werden können.

3.2.5 Zusammenfassung der 2. Pilotstudie

Der zweite Abschnitt der Pilotstudie bestätigte, dass es sich bei dem Tiermodell, bestehend aus Tibiaschaftosteotomie und anschließender intramedullärer Osteosynthese mit bakterieller Kontamination um ein zuverlässiges Modell zur Induktion einer infizierten Pseudarthrose am Tibiaschaft von Ratten handelte. 10^5 KBE als Inokulationsdosis generierten zuverlässig eine auf die operierte Extremität limitierte

Infektion ohne systemische Komplikationen der Versuchstiere, so dass die Anzahl der benötigten Versuchstiere in der Hauptstudie auf ein nötiges Minimum beschränkt werden konnte. Eine Inokulationsdosis von 10^3 KBE erschien aufgrund unzuverlässiger Infektionsgenerierung als unzureichend niedrig. Darüber hinaus korrelierten die angewandten Kriterien der verschiedenen Beurteilungsverfahren einer Weichteil- und Knocheninfektion zu 100%. Eiter, Abszessformationen und Instabilität des Unterschenkels als klinische Zeichen einer Weichteil- und Knocheninfektion wurden ausnahmslos durch die Ergebnisse der Mikrobiologie und Bildgebung in Form der Rasterelektronenmikroskopie, Röntgendarstellung in zwei Ebenen bestätigt. Ergab die klinische Begutachtung keine Hinweise für eine Infektion, so bestätigten alle weiteren Untersuchungsmethoden die stabile Knochenheilung.

Die ausgewählte prolongierte Ceftriaxonprophylaxe mit 0,4 mg/kg KG subkutan für 14 Tage führte zu einer Reduktion an Infektionen. Waren im ersten Abschnitt der Pilotstudie alle Tiere mit 10^3 (Gruppe 1+2) oder 10^5 KBE (Gruppe 3+4) infiziert, betrug die Infektionsrate im zweiten Teil bei 10^3 KBE (Gruppe 7+8) 25% und bei 10^5 KBE (Gruppe 9+10) 75%. Als Inokulationsdosis für die Hauptstudie wurden 10^4 koloniebildende Einheiten verwendet, da 10^3 KBE unzureichend häufig eine infizierte Pseudarthrose induzierte und 10^5 KBE in der Kontrollgruppe (Gruppe 9) zu 50%, sowie zu 100% in der Versuchsgruppe (Gruppe 10) mit Applikation von 200 µg rhBMP-2, in einer Konzentration von 2mg/ml, eine infizierte Pseudarthrose verursachte.

Insgesamt handelt es sich um ein reliables Tiermodell zur Induktion einer infizierten Tibiapseudarthrose unter systemischer Ceftriaxon-Antibiose bei Sprague-Dawley-Ratten. Dies ermöglicht klinisch bewährte Therapieregimes durch adjuvante Therapieoptionen, zum Beispiel der Einsatz von rhBMP-2 zur Prävention infizierter Pseudarthrosen der Tibia nach Fraktur mit bakterieller Kontamination, präklinisch zu untersuchen und zu beurteilen.

3.3 Hauptstudie

Alle Tiere überlebten ohne Komplikationen oder Anzeichen einer systemischen Infektion die postoperative Beobachtungsperiode von sechs Wochen, so dass neben der täglichen Körpergewichtskontrolle und Ausrollen der explantierten K-Drähte auf Agarplatten sieben zufällig ausgewählte Tibiae jeder Gruppe microcomputertomographisch gescannt und anschließend biomechanisch getestet

werden konnten. Zur genaueren Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten wurden die verbleibenden vier Tibiae pro Gruppe zermahlen und durch eine Verdünnungsreihe mit maximaler Dilution von 1:1000 ausgewertet (Tab. 6).

	rhBMP-2	Kontrolle	Total
Gewichtskontrolle	11	11	22
Rasterelektronen- mikroskopie	11	11	22
ausgerollte K-Drähte	11	11	22
µCT	7	7	14
Biomechanik	7	7	14
Verdünnungsreihe	4	4	8

Tabelle 6: Übersicht über die Auswertung der Hauptstudie

3.3.1 klinische Beurteilung

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der rhBMP-2- Gruppe imponierten zehn von elf Versuchstieren (Tab. 7) mit deutlichen Anzeichen einer Weichteil- und Knocheninfektion, gekennzeichnet durch subkutane Eiterformationen, prätibiale Schwellungen, Gelenkergüsse, Gelenkempyeme und lokale Gewebseinschmelzungen. Ein Tier pro Gruppe präsentierte keine klinischen Infektionszeichen (Abb. 18). Allen infizierten Tieren, insgesamt 20 Tiere, war eine abnorme Beweglichkeit des Osteotomieareals gemein. Dagegen präsentierten die zwei verbliebenen Tiere ohne Hinweis auf eine aktuelle oder stattgehabte Infektion stabile Verhältnisse.

	klinische Infektions- zeichen	infektionsfrei	Total
rhBMP-2	10	1	11
Kontrolle	10	1	11

Tabelle 7: Übersicht der klinischen Ergebnisse der Hauptstudie

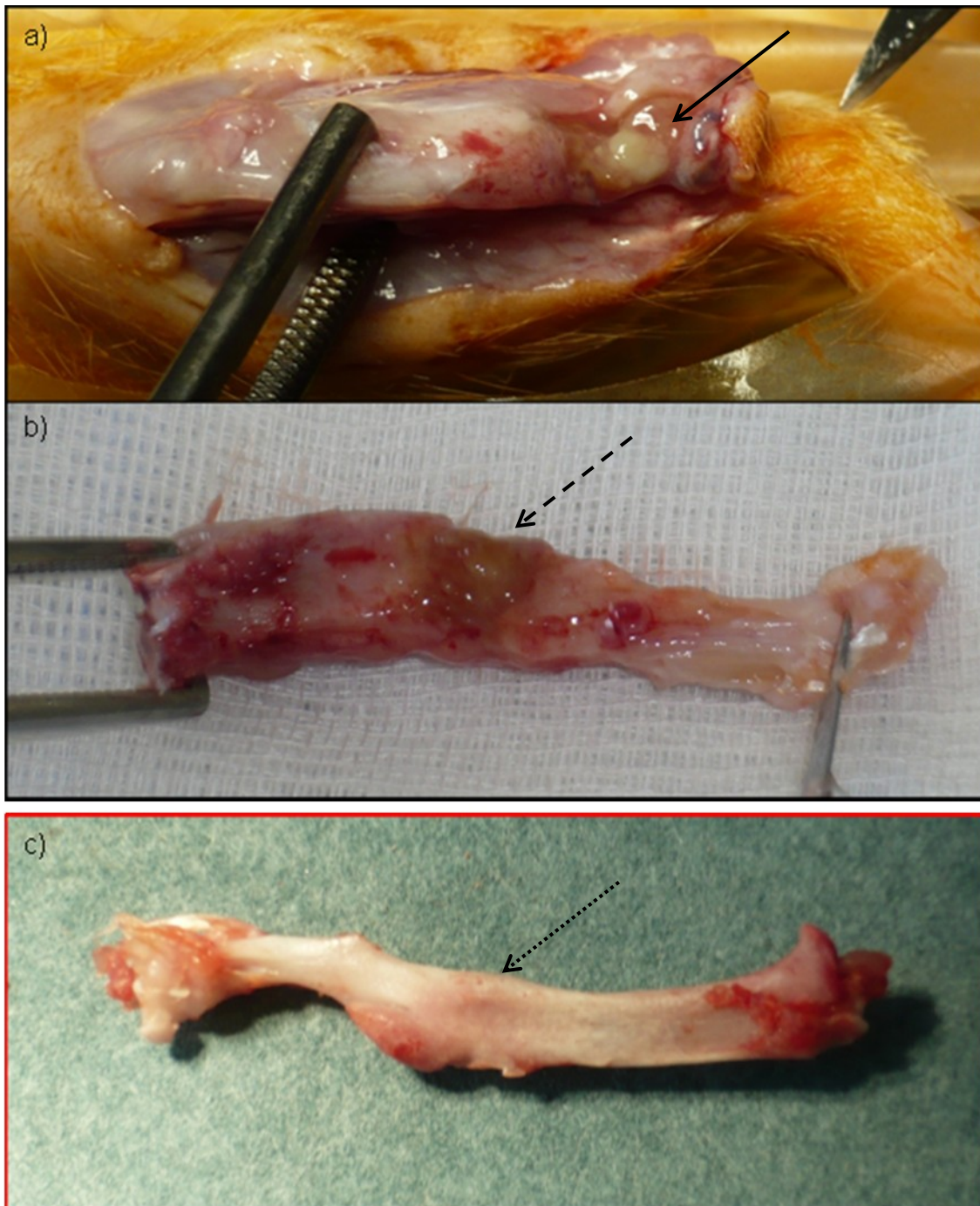


Abbildung 18: Zeichen einer infizierten Pseudarthrose (Pfeil) eines Tieres aus der Kontrollgruppe (a) mit putridem fibrösem Gewebe (gestrichelter Pfeil) im Bereich der Osteotomie (b). Stabile und infektionsfrei verheilte Osteotomie (gepunkteter Pfeil) eines Tieres der rhBMP-2- Gruppe (c).

3.3.2 Körpergewichtsentwicklung

In beiden Gruppen konnte eine signifikante Körpergewichtszunahme für den Beobachtungszeitraum von 42 Tagen beobachtet werden ($p < 0,001$).

Die zusätzliche Applikation von rhBMP-2 führte im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne rhBMP-2 aber nicht zu einer statistisch signifikant erhöhten Körpergewichtszunahme

($p=0,29$). Die Körpergewichtsentwicklung wurde als Profilplot (Wechselwirkungsdiagramm) in Form eines Liniendiagramms dargestellt (Abb. 19). Die Messzeitpunkte eins bis fünf entsprechen den unmittelbar postoperativ, sowie an Tag 7, 14, 21 und Tag 42 durchgeführten Gewichtsmessungen. Das Gewicht der Versuchstiere der BMP-2- Gruppe und der Kontrollgruppe an den jeweiligen Messzeitpunkten wurde als arithmetischer Mittelwert aufgetragen. Hierbei zeigte sich in der rhBMP-2- Gruppe eine Gewichtszunahme um 24% und in der Kontrollgruppe um 15%. Die Tiere der rhBMP-2- Gruppe nahmen im gesamten Beobachtungszeitraum im Vergleich zur Kontrollgruppe 60% mehr Gewicht zu. Auch der Körpergewichtsverlust sieben Tage postoperativ fiel mit 0,6% im Vergleich mit 5% zum Messzeitpunkt 2 (Tag 7 postoperativ) in der Kontrollgruppe moderater aus.

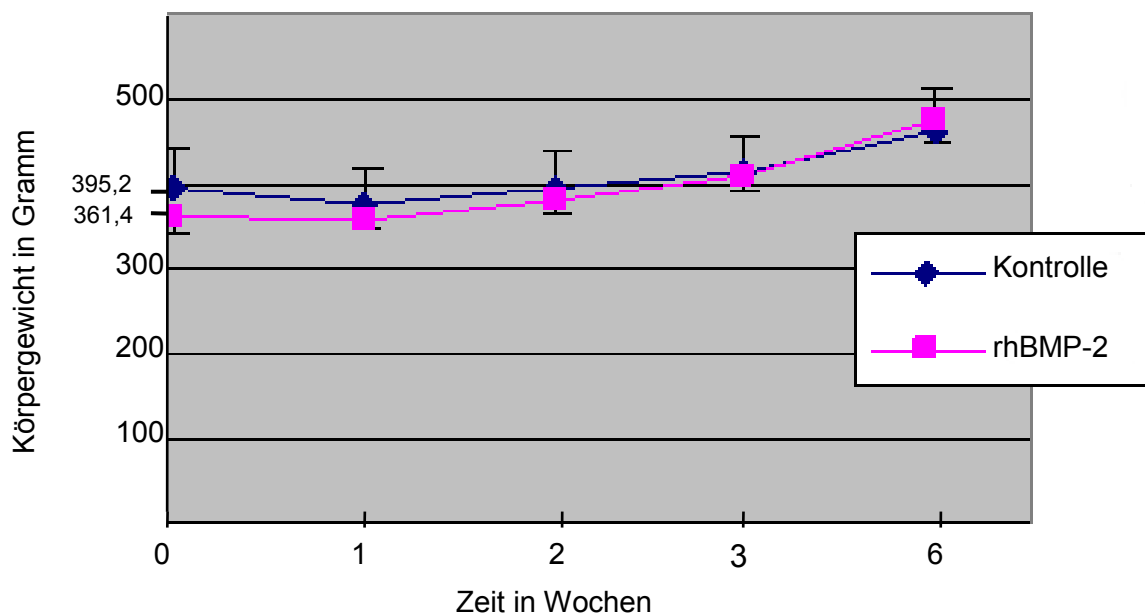


Abbildung 19: Körpergewichtsentwicklung für den Beobachtungszeitraum von 42 Tagen.

Zusammenfassend führte die zusätzliche Applikation von rhBMP-2 in der Versuchsgruppe im Vergleich zur rhBMP-2- freien Behandlung, weder zu einer statistisch signifikant verstärkten Körpergewichtszunahme ($p=0,29$) im gesamten Beobachtungszeitraum von 6 Wochen, noch zu einem statistisch signifikant geringerem postoperativen Körpergewichtsverlust ($p=0,32$).

3.3.3 Röntgen

Analog zu den Ergebnissen der klinischen Untersuchung waren bei zehn von elf Tieren beider Gruppen infizierte Pseudarthrosen mit Knochensequestern, Osteolysen und periostale Auftreibungen, zum Teil über die gesamte Länge der Tibia, als Zeichen einer chronischen Osteitis zu sehen. Sämtliche intramedulläre Implantate waren durch die mechanische Belastung verformt. Die Krümmung erfolgte diaphysär im Defektbereich. Materialbruch als Folge übermäßiger Biegebelastung, trat nicht auf. Die seitliche und a.-p.- Aufnahme, der zwei für klinisch infektionsfrei befundenen Tiere, bestätigte zweifelsfrei die kortikale Überbrückung aller vier Cortices und regelrechte Osteointegration des Marknagels (Abb. 20).

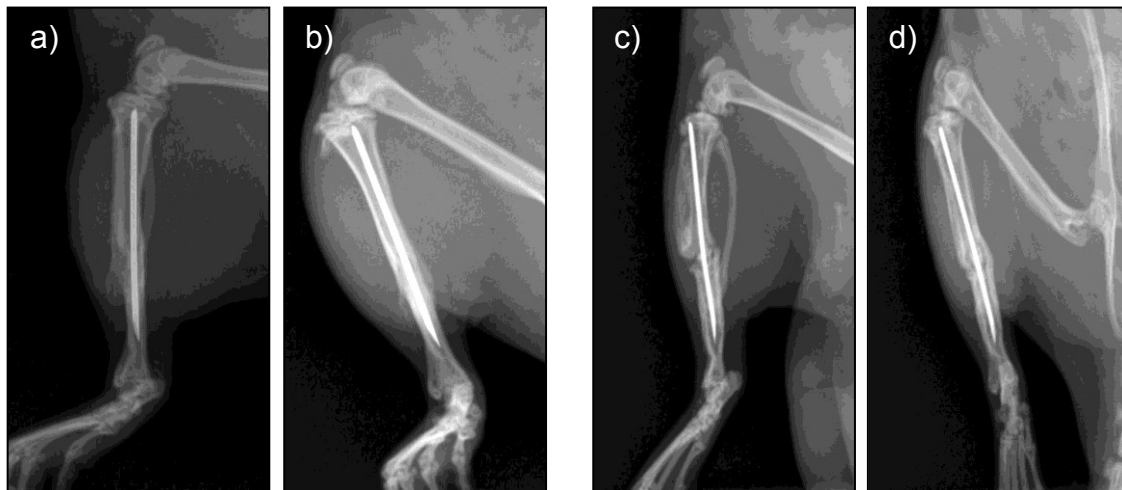


Abbildung 20: Frakturheilung mit Überbrückung der vier Cortices in 2 Ebenen (a, b) ohne Merkmale einer Infektion bei einem Tier der rhBMP-2- Gruppe. Infizierte Pseudarthrose in 2 Ebenen (c, d) bei einem Tier aus der rhBMP-2- Gruppe mit deutlicher Knochensequestrierung.

3.3.4 Micro-CT

Für sieben zufällig ausgewählte Tiere aus der Versuchs- als auch Kontrollgruppe wurde ein Mikro-CT durchgeführt (Abb. 21). In beiden Gruppen hatten jeweils sechs Tiere eine infizierte Pseudarthrose und ein Tier war knöchern konsolidiert (Tab. 8). Die zwei Tiere mit geheilter Fraktur waren identisch mit den zwei klinisch und radiologisch blanden Tieren.

	Pseudarthrose	infektionsfrei	Total
rhBMP-2	6	1	7
Kontrolle	6	1	7

Tabelle 8: Ergebnisse der μ CT- Scans

Für den t-Test zur Überprüfung signifikanter Unterschiede des Quotienten (TV/BV) aus kalifiziertem Knochenvolumen (BV) zu gescanntem Gesamtvolumen (TV) bestanden zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede ($p=0,26$). Somit führte die Anwendung von rhBMP-2 in der Versuchsgruppe nicht zu einer statistisch signifikanten Veränderung des Verhältnisses von kalifiziertem knöchernem Gewebe zu Gesamtgewebe. Eine eventuell zu erwartende, durch rhBMP-2 Applikation, induzierte Osteogenese, mit höherem Quotienten im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne rhBMP-2 Anwendung, fand nicht in einem statistisch signifikanten Ausmaß statt.

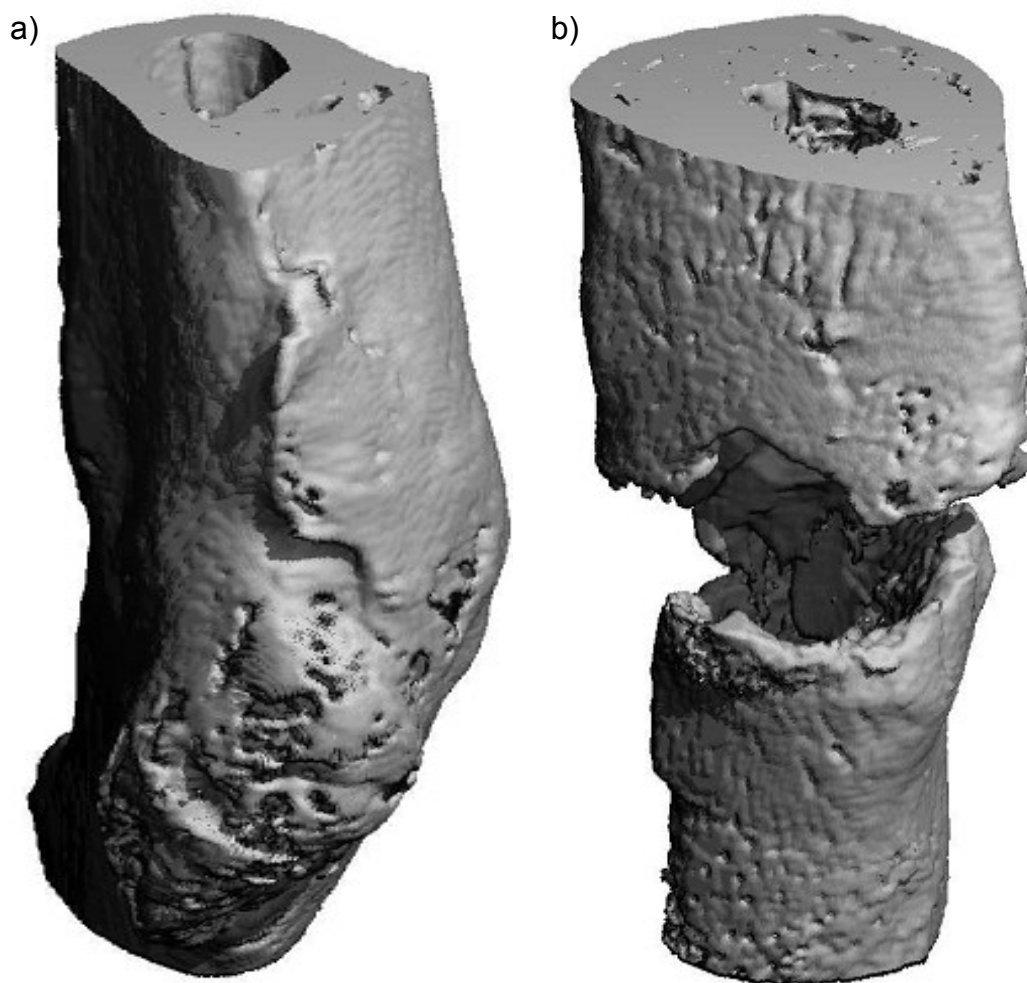


Abbildung 21: Kortikale Überbrückung (a) der vier Cortices des infektionsfreien Tieres der rhBMP-2-Gruppe. Ausgebliebene knöcherne Überbrückung des Osteotomiespaltes mit Knochensequesterformationen eines Versuchstieres mit Anwendung von rhBMP-2 (b).

3.3.5 Mikrobiologie

Durch die zusätzliche Applikation von rhBMP-2 konnten die mikrobiologischen Ergebnisse nicht statistisch signifikant verbessert werden. 20 von 22 (90,9%) der explantierten K-Drähte führten nach Ausrollen auf Agarplatten zu positivem Kulturenwachstum. Die bakterielle Besiedlung der eingebrachten Implantate betrug sowohl in der rhBMP-2- Gruppe als auch in der Kontrollgruppe näherungsweise 10^4 KBE pro K-Draht. In allen Fällen geht aus dem Verteilungsmuster der auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien eindeutig eine über den Osteotomiespalt hinausreichende Besiedlung der K-Drähte von der Insertionsstelle an der Tuberositas tibiae bis zum distalen Ende des K-Drahtes im Bereich der distalen Tibiametaphyse hervor. Zwei sterile K-Drähte führten zu zwei sterilen Agarplatten frei von Bakterienkolonien (Abb. 22). Diese K-Drähte entstammten den klinisch und in der Bildgebung (Röntgen+Mikro-CT) unauffälligen Tieren mit regelrechter Frakturheilung.

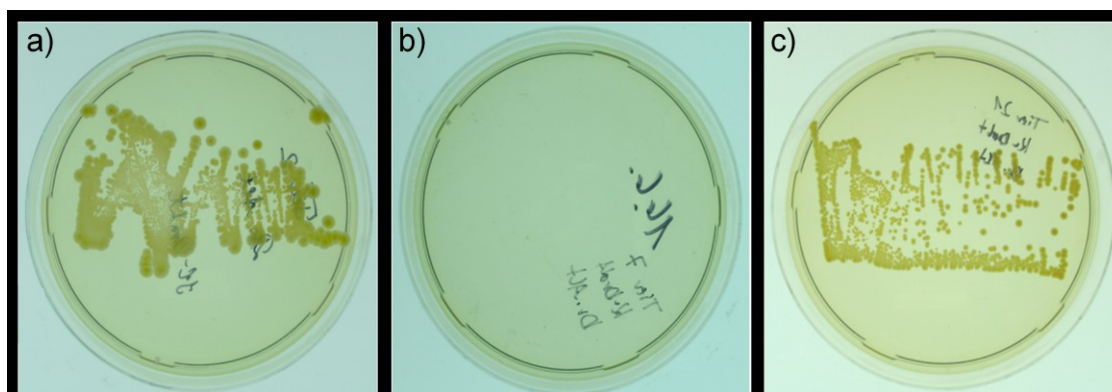


Abbildung 22: Resultate nach 24 Stunden Bebrütung der BHI-Agarplatten bei 37 °C. Unter Applikation von 200 µg rhBMP-2 positives Kulturenwachstum (a), als auch sterile Verhältnisse bei stattgefundener Knochenheilung beobachtbar (b). Agarplatte eines kolonisierten K-Drahtes von einem Tier der Kontrollgruppe (c).

Von den exartikulierten Tibiae wurden vier pro Gruppe zufällig ausgewählt, zermahlen und zur Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten pro Gramm Knochen durch eine Dilutionsreihe mit maximaler Verdünnung um den Faktor 1000 ausgewertet.

Durch die zusätzliche Anwendung von rhBMP-2 konnte in diesem Modell die Anzahl koloniebildender Einheiten eines biofilmbildenden *Staphylococcus aureus* (EDC 5055) statistisch signifikant gesenkt werden ($p=0,032$).

Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Gramm Knochen im geometrischen Mittel bei linksgipfeliger Verteilung waren $1,60 \cdot 10^4$ für die rhBMP-2, respektive $28,4 \cdot 10^4$ für die Kontrollgruppe (Tab. 9). Somit war die bakterielle Last pro Gramm Knochen im geometrischen Mittel in der Versuchsgruppe um 94,4% geringer als in der Kontrollgruppe (Abb. 23).

Gruppe	Tiernummer	KBE/g Knochen	Geometrischer Mittelwert KBE/g Knochen
rhBMP-2	rhBMP-2 Nr.1	$6,44 \cdot 10^3$	$1,60 \cdot 10^4$
	rhBMP-2 Nr.2	$4,47 \cdot 10^4$	
	rhBMP-2 Nr.3	$1,30 \cdot 10^4$	
	rhBMP-2 Nr.4	$1,75 \cdot 10^4$	
Kontrolle	Kontrolle Nr.1	$2,79 \cdot 10^4$	$28,4 \cdot 10^4$
	Kontrolle Nr.2	$2,75 \cdot 10^5$	
	Kontrolle Nr.3	$2,81 \cdot 10^5$	
	Kontrolle Nr.4	$3,02 \cdot 10^6$	

Tabelle 9: Koloniebildende Einheiten pro g Knochen

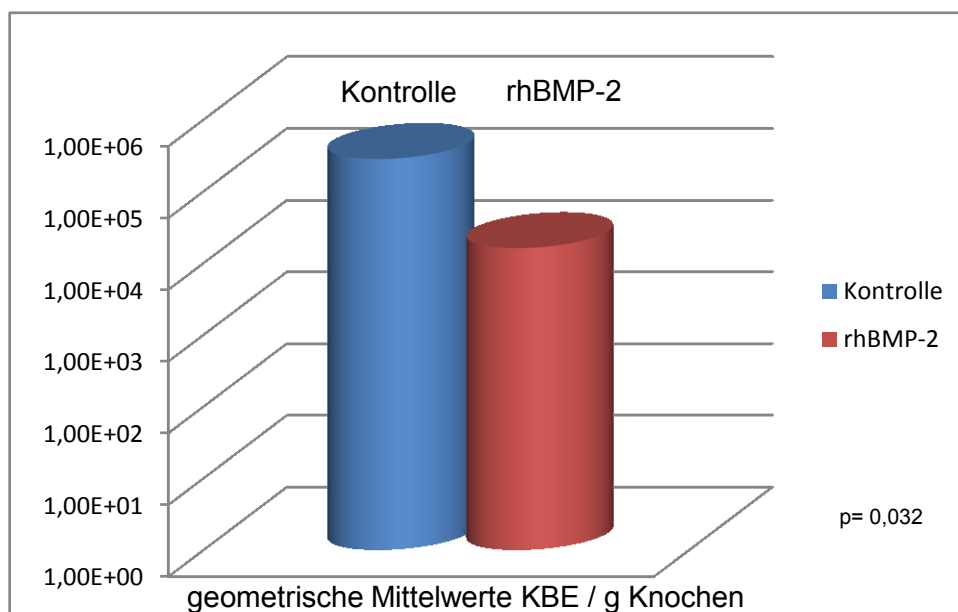


Abbildung 23: Darstellung der geometrischen Mittelwerte KBE/g Knochen

3.3.6 Rasterelektronenmikroskopie

Die explantierten Implantate der Tiere mit infizierter Tibiapseudarthrose zeigten Kolonien kokkoider Bakterien eingebettet in eine für Biofilm typische hochvisköse extrazelluläre Matrix. Die K-Drähte der zwei nicht infizierten Tiere waren frei von extrazellulärer Matrix mit Ansammlungen kokkoider Bakterien (Abb. 24).

Die Rasterelektronenmikroskopie bestätigte, neben der nach klinischen, mikrobiologischen und radiologischen Kriterien manifesten infizierten Pseudarthrose, die Induktion der Infektion durch den in den Osteotomiespalt eingebrachten

Staphylococcus aureus. Die Besiedlung des K-Drahtes ist das morphologische Korrelat einer persistierenden Implantat-assoziierten Knocheninfektion.

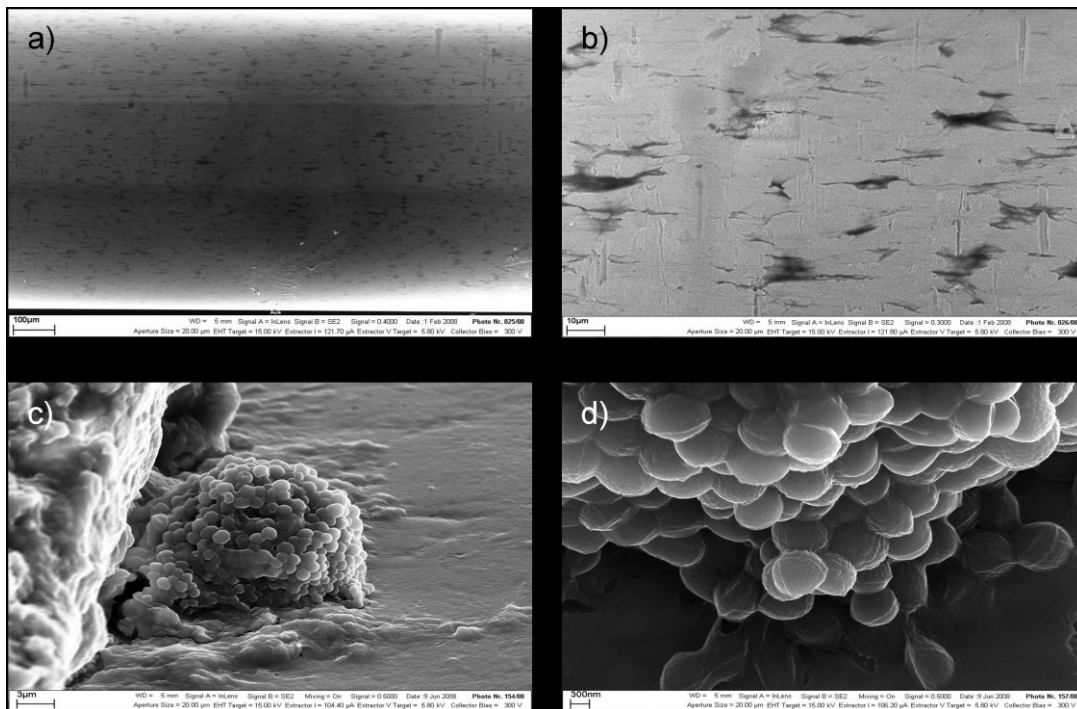


Abbildung 24: Steriler K-Draht eines nicht infizierten Tieres (a, b). Anhäufung kokkoider Bakterien mit Biofilmbildung (c), die in höherer Vergrößerung gut voneinander abgrenzbar sind (d).

3.3.7 Biomechanik

Die biomechanische Testung von insgesamt 14 zufällig ausgewählten Tibiae ergab für die zusätzliche rhBMP-2 Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe keine statistisch signifikant höhere Torsionssteifigkeit ($p=0,6$). Für die sieben getesteten Tibiae aus der rhBMP-2- Gruppe bestand eine geringfügig höhere Torsionssteifigkeit mit 0,09 Nm im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 0,065 Nm. Das Versuchstier aus der rhBMP-2- Gruppe mit erfolgreicher knöcherner Konsolidierung zeigte mit 0,3 Nm die höchste Rigidität, gefolgt von der geheilten Fraktur aus der Kontrollgruppe mit 0,21 Nm (Abb. 25).

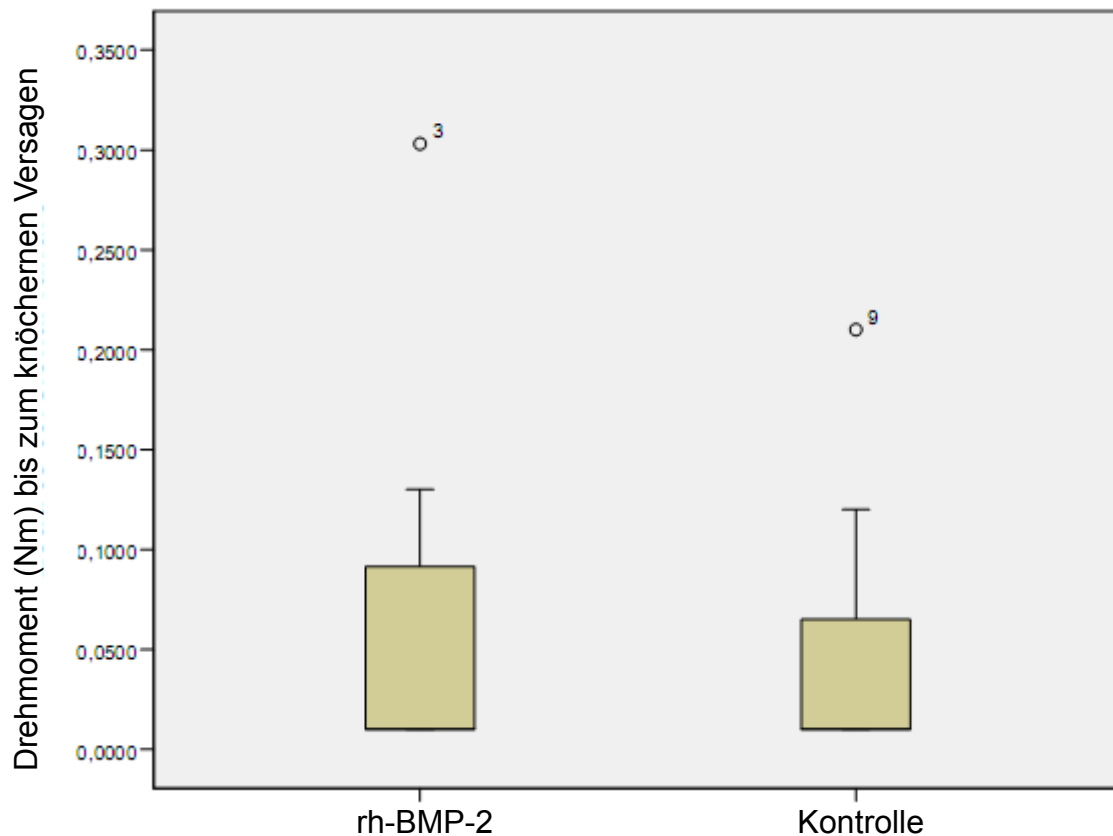


Abbildung 25: Biomechanische Torsionssteifigkeit

3.3.8 Zusammenfassung der Hauptstudie

Das Tiermodell führte nach Tibiaschaftosteotomie und anschließender intramedullärer Osteosynthese mit bakterieller Kontamination von 10^4 koloniebildenden Einheiten eines *Staphylococcus aureus* mit ausgeprägter Biofilmbildungskapazität sowohl in der Versuchsgruppe mit Verwendung von rhBMP-2, als auch in der Kontrollgruppe in 90,9% zu einer infizierten Tibiapseudarthrose. Die Infektion beschränkte sich stets auf die operierte Extremität, ohne dass systemische Komplikationen beobachtet wurden. Wie auch in der vorangegangenen zweiteiligen Pilotstudie korrelierten die Befunde der verschiedenen Beurteilungsverfahren für eine Weichteil- und Knocheninfektion exakt miteinander. Subkutane fluktuierende Schwellungen, Eiter, Fisteln, Abszessformationen und Instabilität des Tibiaschaftes als klinische Zeichen einer infizierten Tibiapseudarthrose wurden mikrobiologisch, radiologisch und rasterelektronenmikroskopisch ausnahmslos bestätigt. Die im Vergleich zur Kontrollgruppe moderat erhöhte Körpergewichtszunahme, sowie ein geringerer postoperativer Gewichtsverlust, als auch eine geringfügig höhere Torsionssteifigkeit, war nicht statistisch signifikant von der rhBMP-2- Applikation abhängig. Durch die

zusätzliche Anwendung von 200 µg rhBMP-2, in einer Konzentration von 2 mg/ml, konnte die „Bakterienlast“ pro Gramm Knochen statistisch signifikant gesenkt werden. Ein etwaiger positiver Einfluss auf die klinischen und radiologischen Ergebnisse konnte dabei nicht ermittelt werden. Auch eine auf Grund der geringfügig verbesserten Torsionssteifigkeit suggerierte Erhöhung des Quotienten aus kalzifiziertem Knochenvolumen zu gescanntem Gesamtknochenvolumen wurde durch das Mikro-CT nicht bestätigt. Bei jeweils einem Tier pro Untersuchungsgruppe lagen keine klinischen Anzeichen für eine Infektion vor, so dass durch alle weiteren Untersuchungsverfahren eine stabile Knochenheilung bestätigt wurde.

4 Diskussion

Die offene Tibiaschaftfraktur stellt die häufigste offene Fraktur beim Menschen dar und wird überwiegend durch ein Hochrasanztrauma verursacht. Die geringe Weichteildeckung in Kombination mit einem Hochrasanztrauma führt dazu, dass mehr als die Hälfte der offenen Tibiafrakturen nach Gustilo und Anderson als drittgradig offene Frakturen zu klassifizieren sind (Court-Brown et al., 1998; Court-Brown und Caesar, 2006; Hansen et al., 2002).

Offene Tibiafrakturen sind durch die Eröffnung der Haut potentiell kontaminiert und stellen, trotz verbesserter Operationstechnik und kontinuierlicher Fortentwicklung der Osteosynthesematerialien und rekonstruktiven Knochen- und Weichteilplastiken, für Patienten und behandelnde Ärzte ein besonders komplexes und herausforderndes Krankheitsbild dar.

Schwerwiegendste und therapeutisch anspruchsvollste Komplikation ist die posttraumatische tiefe Knochen- und Weichteilinfektion die regelmäßig zu einer infizierten Pseudarthrose führt und bei über 50% der Patienten durch Stämme von *Staphylococcus aureus* verursacht wird. (Scheithauer et al., 2012; Trampuz und Zimmerli, 2005). Insbesondere drittgradig offene Frakturen sind aufgrund des ausgeprägten Weichteilschadens besonders vulnerabel für die Entwicklung einer infizierten Pseudarthrose (Papakostidis et al., 2011).

Neben der kontinuierlichen Weiterentwicklung von Osteosynthesematerialien und Operationstechniken ist die Stimulation des physiologisch vorhandenen Regenerationspotentials des Knochens zur Verbesserung der klinischen Behandlungsergebnisse von besonderem Interesse. Bevorzugt eignen sich körpereigene osteoinduktive Substanzen, die maßgeblich die Knochenbruchheilung stimulieren und regulieren.

1965 beschrieb der kalifornische Orthopäde Prof. Marshall Urist die Möglichkeit nach Injektion dekalzifizierter Knochenmatrix in Muskelgewebe, Knochen ekto *de-novo* zu bilden (Urist, 1965). Verantwortlich seien Bioproteine, sogenannte Bone Morphogenetic Proteins, die zur TGF- β - Superfamilie gehören (Urist et al., 1979). Bone Morphogenetic Protein 2 wurde 1988 erstmals isoliert und kann seitdem weniger aufwändig rekombinant produziert werden (Wozney et al., 1988). In multiplen experimentellen Studien konnten sowohl rhBMP-7 (Cook et al., 1994; Cook et al., 1995; Vögelin et al., 2005) als auch rhBMP-2 (Yasko et al., 1992; Zegzula et al., 1997) ihre osteoinduktiven Eigenschaften bei kritischen Defekten langer Röhrenknochen unter Beweis stellen.

Kloen et al. (2002) zeigten eine anhaltende Expression von humanem BMP-2, BMP-4, BMP-7 und ihrer Rezeptoren BMPR- IA, BMPR- IB und BMPR- II bei verzögerter Frakturheilung und nicht infizierten Pseudarthrosen als Korrelat der experimentellen Ergebnisse auf zellulärer Ebene. BMPs können separat an die Rezeptoren binden. Die Bindung von BMP- 2 an BMPR- II wird durch die Koexpression der Typ I Rezeptoren verstärkt. Erst die Bindung an beide Rezeptortypen führt zu ausreichender Kinaseaktivität und Signaltransduktion (Liu et al., 1995). Brick et al. (2009) bestätigten die gesteigerte Expression von BMPR- II bei infizierten segmentalen Femurdefekten an Ratten, wenn zusätzlich 200 µg rhBMP-2 verwendet wurde und suggerieren somit, dass Osteoblasten im Rahmen von akuten Knocheninfektionen weiterhin responsiv für rhBMP-2 sind und BMP-2 seine osteoinduktiven Eigenschaften behalten hat.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die osteoinduktiven Effekte von rhBMP-2 auf die Infektentwicklung und Knochenbruchheilung aufgrund vielversprechender klinischer Beobachtungen (Govender et al., 2002; Swiontkowski et al., 2006) mit Hilfe eines zuvor etablierten Tiermodells (Alt et al., 2011) bei *Staphylococcus aureus* kontaminierten Tibiaschaftosteotomien zu untersuchen.

4.1 Tiermodell

Zahlreiche Tiermodelle zur Induktion einer Osteitis der Tibia (An et al., 2006) sind in der Literatur bekannt. Keines von ihnen (Buxton et al., 2005; Fukushima et al., 2005; Hill et al., 2002; Li et al., 2008; Lucke et al., 2003a; Lucke et al., 2003b; Lucke et al., 2005; Mc Pherson et al., 2008; Monzon et al., 2001; Poultides et al., 2008; Salgado et al., 2005) simuliert die pathophysiologische Entwicklung einer posttraumatischen infizierten Tibiapseudarthrose durch eine intramedulläre Implantat-assoziierte Infektion nach drittgradig offener Tibiaschaftfraktur, da keines die direkte bakterielle Kontamination der Osteotomie im Tibiaschaftbereich nach Einbringen des intramedullären Implantates vorsieht.

Das hier verwendete und etablierte Modell einer Implantat-assoziierten infizierten posttraumatischen Pseudarthrose des Tibiaschaftes (Alt et al., 2011) imponiert durch eine exakte Korrelation der angewandten Methoden zur Beurteilung einer Infektion und der Frakturheilung. Bei allen 36 Tieren aus den zwei Pilotstudien und der Hauptstudie mit klinischen Zeichen einer infizierten Pseudarthrose konnte diese mit den weiteren Beurteilungsverfahren ausnahmslos bestätigt werden. Wurden Rötungen und

Schwellungen der Weichteilgewebe, Abszessformationen, Fisteln, Eiter oder Gelenkergüsse als klinische Verdachtsmomente einer infizierten Pseudarthrose nach kontaminierter Osteotomie beobachtet, zeigten sich in der Bildgebung (Röntgen und μ CT) Knochendestruktionen, Knochensequester, periostale Auftreibungen und Bereiche mit kortikaler Lyse. Die dann ausgerollten K-Drähte und Verdünnungsreihen der zermahlenen Tibiae führten zu positivem Kulturenwachstum auf BHI-Agarplatten. Farbe und Anordnung der Kolonien auf den Agarplatten schlossen eine Fremdkontamination aus. Mithin kann nur der eingesetzte *Staphylococcus aureus* für die Induktion der Infektion verantwortlich gemacht werden. Das Vorgehen unter sterilen Operationsbedingungen, ausschließlich mit Materialien aus der Humanmedizin zum Arbeiten unter aseptischen Bedingungen, verhinderte eine diese Studie gefährdende Kontamination der Tibiaschaftosteotomien mit unbekannten sekundären Erregern. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der explantierten K-Drähte zeigten Kolonien kokkoider Bakterien eingebettet in eine für Biofilm typische hochvisköse extrazelluläre Matrix. Die biofilmbildenden Eigenschaften des *Staphylococcus aureus* EDCC 5055 wurden so bestätigt. Neben der direkten Kontamination stellt die Persistenz des Erregers auf den Implantaten einen wichtigen Pathogenitätsmechanismus für infizierte Pseudarthrosen dar (Patzakis und Zalavras, 2005). Die Infektion beschränkte sich stets auf die operierte Extremität. Fieber, Tachykardie und Tachypnoe als klinische Parameter einer systemischen Infektion (Lorenz, 2009) traten nicht auf. Alle Tiere in der Hauptstudie, ob mit oder ohne Knocheninfektion, zeigten eine strenge Körpergewichtszunahme im Beobachtungszeitraum von sechs Wochen nach einem postoperativen Gewichtsverlust in der ersten Woche von 0,6% in der BMP-2- Gruppe, respektive von 5% in der Kontrollgruppe. Eine statistisch signifikant gesteigerte Körpergewichtszunahme durch rhBMP-2 im Vergleich zur BMP-2- freien Behandlung wurde nicht beobachtet. Die insgesamt sechs Tiere mit blander Klinik bezüglich einer infizierten Pseudarthrose wiesen sterile Agarplatten und K-Drähte auf. In der Bildgebung bestätigte sich die knöcherne Konsolidierung. Die exakte Korrelation der angewandten verschiedenen diagnostischen Verfahren verleiht dem Modell ein hohes Maß an Reliabilität für die Entwicklung einer infizierten Pseudarthrose als auch für die reguläre Knochenheilung. Zusammenfassend bietet dieses Modell, auf Grundlage der erreichten Annäherung an das klinische Szenario einer kontaminierten offenen Tibiaschaftfraktur, die Möglichkeit sämtliche Therapiebausteine zu variieren und *in vivo* zu beurteilen.

4.2 Klinische Studien zur Anwendung von rhBMP-2

In verschiedenen präklinischen und klinischen Studien zur Knochenheilung führte der Zusatz von rhBMP-2 zu geringeren Infektions- und höheren Fusionsraten im Vergleich zur Standardbehandlung ohne rh-BMP-2.

In einer 450 Patienten umfassenden prospektiven randomisierten multizentrischen Studie reduzierte die Applikation von rhBMP-2 auf einem Kollagenschwamm statistisch signifikant die Anzahl sekundärer Eingriffe, beschleunigte die Frakturheilung und senkte sowohl Infektionsrate als auch Pseudarthrosenrate bei drittgradig offenen Tibiafrakturen (Govender et al., 2002). Die Aussagekraft dieser Studie ist durch das Ungleichgewicht in der Behandlung zwischen Versuchsgruppe mit rhBMP-2 und Kontrollgruppe ohne rhBMP-2 limitiert. In der Versuchsgruppe werden 41% und in der Kontrollgruppe nur 27% der Frakturen mit einem Marknagel nach Aufbohrung des Markkanals versorgt. Zudem wurden frakturierte Fibulae ab einer Defektgröße >2 mm zusätzlich plattenosteosynthetisch versorgt. Die Stabilisierung der Fibula verbessert die Bedingungen der Frakturheilung für Tibiafrakturen (Horn et al., 2008). In einer von Swiontkowski et al. (2006) durchgeführten Datenanalyse der verschiedenen Subgruppen der BESST-Studie (BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma; Govender et al., 2002) in die weitere 60 Patienten einer unveröffentlichten amerikanischen Studie einbezogen wurden, bestätigte sich insbesondere für drittgradig offene Frakturen die statistisch signifikante Reduktion der Infektions- und Pseudarthrosenrate als auch die akzelerierte Frakturheilung für die Kombination Marknagelosteosynthese in aufgebohrter Technik plus Applikation von rhBMP-2 in einer Konzentration von 1,5 mg/ml im postoperativen Follow-up- Zeitraum von 12 Monaten.

Jones et al. (2006) verglichen in einer randomisierten prospektiven Studie rhBMP-2 und Allograft mit Autograft zur Rekonstruktion diaphysärer Tibiafrakturen mit kortikalen Defekten. Die Kombination Allograft mit rhBMP-2 führte zu äquivalenten Ergebnissen im Vergleich zum bis dato gültigen „Goldstandard“ Autograft. Nachteilig wirkt sich auf die Aussagekraft die geringe Anzahl von 15 Patienten pro Gruppe und die geringeren Defektgrößen in der rhBMP-2 Gruppe aus. Bisherige klinische Studien zur Anwendung von rhBMP-2 bei diaphysären Tibiafrakturen (Govender et al., 2002; Jones et al., 2006; Swiontkowski et al., 2006) beschränken sich im Gegensatz zu tierexperimentellen Studien ausschließlich auf die Applikation von BMP-2 zum Zeitpunkt des definitiven Wundverschlusses nach erfolgreichem Wundmanagement. Dazu gehörte das wiederholte Débridement der Wunde, rekonstruktive Knochen- und Weichteileingriffe zur Revaskularisierung und Deckung des Defektes, als auch die temporäre externe

Fixation der Tibia bis zur Konsolidierung des traumatisierten Weichteilmantels und anschließende Konversion zur Marknagelosteosynthese. Die klinische Anwendung von rhBMP-2 beschränkt sich somit auf Tibiaschaftfrakturen mit vitaler Wundfläche ohne Anzeichen einer bakteriellen Kontamination oder Infektion. Patienten mit stark verschmutzten, offensichtlich bakteriell kontaminierten, Frakturen wurden ebenso wie Patienten mit präexistierenden anderen Infektionen von diesen Studien ausgeschlossen, so dass bisher keine klinischen Studien zur Beurteilung der Effekte von rhBMP-2 auf die Infektentwicklung und die Knochenbruchheilung frakturierter Tibiae bei offensichtlich bakterieller Kontamination existieren.

Allen et al. (2007), Aryan et al. (2007) und O'Shaughnessy et al. (2008) berichten über eine hohe Fusionsrate, weniger Materialversagen, geringe Rezidivquoten und gute klinische Resultate, wenn rhBMP-2 im „Off-Label-Use“ zur Behandlung pyogener vertebraler Osteomyelitiden eingesetzt wurde. Fehlende gematchte Kontrollgruppen, kleine und nicht repräsentative Patientenkollektive von 14, 15 und 20 Patienten, verschiedene operative Zugänge und Verfahren, ein breites Spektrum an Erregern und zahlreiche Komorbiditäten üben negativen Einfluss auf die Aussagen hinsichtlich positiver Effekte von rhBMP-2 aus. Auch diese Studien umfassten ein obligat durchgeführtes Wundmanagement, bestehend aus repetitivem Wunddébridement und Defektdeckung, zur Schaffung vitaler und bakterienfreier Knochen- und Weichteilverhältnisse.

Klinische Studien zur Beurteilung der Effekte von rhBMP-2 auf die Knochenheilung von offenen Frakturen mit bakterieller Kontamination existieren bisher weder für frakturierte Tibiae noch für andere Knochen.

4.3 Experimentelle Studien zur Anwendung von rhBMP-2

Um der langwierigen und komplikationsreichen Behandlung einer Knocheninfektion Rechnung zu tragen, stehen im Gegensatz zu klinischen Studien, die Infektentwicklung und Knochendefektheilung bakteriell stark kontaminierter Knochen verstärkt im Fokus der präklinischen tierexperimentellen Forschung.

Präklinische Studien für bakterielle Knocheninfektionen zeigen sowohl für BMP-2 als auch BMP-7 positive Trends hinsichtlich Frakturheilung und Infektionsrate. Das von Chen et al. (2007) entwickelte Modell einer chronisch infizierten Femurpseudarthrose bei Ratten beinhaltet die direkte Kontamination eines 6 mm großen segmentalen Femurdefektes mit einer Inokulationdosis von 10^4 KBE eines *Staphylococcus aureus*

Stammes. Der Defekt wurde mit einer Polyacetylplatte und sechs K-Drähten stabilisiert. Die Wunde wurde zwei Wochen nach primärem Wundverschluss revidiert und radikal débridiert. Anschließend wurde der Kollagenschwamm mit rhBMP-2 appliziert und die Wunde primär verschlossen. Die Etablierung der Infektion wurde durch positive Bakterienkulturen zum Zeitpunkt der Wundrevision bestätigt. RhBMP-2 führte dosisabhängig zu einer statistisch signifikanten Knochenbildung im Defektareal, die durch eine zusätzliche subkutane Antibiotikaphylaxe mit Ceftriaxon für vier Wochen nach Débridement noch gesteigert werden konnte. In den Kontrollgruppen war radiologisch und histologisch keine Knochenbildung im Defektareal messbar. Eine vollständige knöcherne Überbrückung wurde auch bei Tieren mit der höchsten angewandten Dosis von 200 µg rhBMP-2, in einer Konzentration von 2 mg/ml, und systemischer Ceftriaxon-Antibiose nach 12 Wochen nicht erzielt, so dass sich auch in der biomechanischen Testung keine statistisch signifikanten Vorteile für BMP-2 ergaben. Darüber hinaus konnte keine einzige Infektion vollständig eliminiert werden, da alle angelegten Bakterienkulturen zum Zeitpunkt der Euthanasie positiv für den eingesetzten *Staphylococcus aureus* waren.

Mit identischem Tiermodell konnte für rhBMP-7, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne BMP, histologisch und radiologisch eine dosisabhängige statistisch signifikante Neubildung von Knochen im Defektbereich trotz persistierender Infektion nachgewiesen werden. Auch in dieser Studie konnte keine vollständige knöcherne Fusion beobachtet werden (Chen et al., 2006).

Southwood et al. (2004) verfolgen einen anderen Ansatz der BMP-2 Applikation. Ein Femurdefekt von 10 mm im Kaninchenmodell wird ebenfalls plattenosteosynthetisch versorgt und durch zwei zusätzliche Zerklagen um die Plattenosteosynthese gesichert. Das Defektareal wird am zweiten postoperativen Tag perkutan mit $5 \cdot 10^6$ KBE eines *Staphylococcus aureus* infiziert. Zusätzlich wurde eine sklerosierende Flüssigkeit zur beschleunigten Etablierung der Knocheninfektion in die beiden Femurenden injiziert. Unmittelbar im Anschluss wurden die Zellen im Defektbereich mit dem Ziel einer gesteigerten endogenen BMP-2 Expression, ebenfalls perkutan, durch einen adenoviralen Vektor mit BMP-2 Genen (Ad-BMP-2) transfiziert. Die Behandlung mit Ad-BMP-2 führte im Vergleich zu Kontrolltieren zu einer histologisch und radiologisch nicht statistisch signifikanten, moderat gesteigerten, Knochenbildung. Bisher gibt es also keine ausreichenden Daten von präklinischen *in vivo* Studien für eine intern stabilisierte, bakteriell massiv kontaminierte, Osteotomie mit zusätzlicher Applikation eines mit rhBMP-2 versetzten Kollagenschwammes. Bereits durchgeführte tierexperimentelle Studien beschränken sich auf chronische Infektionen die entweder

revidiert werden oder gentherapeutische Ansätze verfolgen, die in der klinischen Anwendung, auch aus ethischen Gründen, nicht etabliert sind. Die mit der vorliegenden Studie gewonnenen Erkenntnisse sollen auf Basis des etablierten Tiermodells klinische Szenarien simulieren um Rückschlüsse auf die Effekte von rhBMP-2 bei kontaminierten Frakturen langer Röhrenknochen zu ziehen.

4.4 Ergebnisse im Vergleich zu anderen präklinischen und klinischen Studien

In dieser Studie konnte für rhBMP-2 im Gegensatz zu den erwähnten klinischen Studien (Allen et al., 2007; Aryan et al., 2007; Govender et al., 2002; O'Shaughnessy et al., 2008; Swiontkowski et al., 2006) kein positiver, statistisch signifikanter, Effekt auf die Infektentwicklung und Pseudarthrosenrate beobachtet werden. In der Versuchsgruppe und in der Kontrollgruppe präsentierten 90,9% (10/11) der Versuchstiere eine infizierte Tibiapseudarthrose. In der rhBMP-2- Gruppe konnte die Anzahl der Bakterien pro Gramm Knochen statistisch signifikant gesenkt werden. Ein wesentliches Kriterium einer erfolgreichen Frakturheilung ist neben der blanda Klinik (ohne Functio laesa und klassische Entzündungszeichen wie Rubor, Dolor, Calor und Tumor), die knöcherne Durchbauung drei von vier Cortices in bildgebenden Verfahren (Govender et al., 2002). Die Anwendung von 200 µg rhBMP-2, in einer Konzentration von 2 mg/ml, führte in dieser Studie zu keinen statistisch signifikanten radiologischen Unterschieden.

Darüber hinaus verhalten sich die hier erhobenen radiologischen Ergebnisse teilweise komplementär zu den Ergebnissen anderer experimenteller Studien (Chen et al., 2006 und 2007), die über eine vermehrte Knochenbildung im Defektareal trotz einer persistierenden staphylogenen Knocheninfektion berichten.

Eine mögliche Ursache liegt in der bisherigen Anwendung von rhBMP-2 in klinischen Studien (Govender et al., 2002), die sich streng an den empfohlenen Therapiealgorithmus gehalten haben, der bei offenen Tibiafrakturen vor definitiver Marknagelosteosynthese und etwaiger Applikation von BMP-2, neben der temporären Anlage eines Fixateurs externe, zunächst eine ausgiebige Wundtoilette und Schaffung nicht infektiöser Wundverhältnisse vorsieht (Diefenbeck et al., 2006; Hofman et al., 1997; Sanders et al., 1994). Auch die klinischen Studien zum „Off-Label-Use“ von rhBMP-2 bei pyogenen vertebralen Osteomyelitiden sehen ein obligates Wundmanagement vor (Allen et al., 2007; Aryan et al., 2007; O'Shaughnessy et al.,

2008). Nach Resektion potentiell kontaminierter, infizierter, minderperfundierter und nekrotischer Gewebsareale dürfte einerseits die Anzahl vorhandener Bakterien drastisch reduziert worden sein und andererseits verbliebenen Bakterien dadurch ein leicht zu kolonisierendes Gewebe entzogen worden sein, welches die Entwicklung einer Knochen- und Weichteilinfektion begünstigt. Zum Teil wurden zur adäquaten Defektdeckung weitere Knochen- und Weichteilplastiken durchgeführt (Govender et al., 2002), die zu einer Reduktion der Vulnerabilität von frakturierten Knochen für Knocheninfektionen führt (Akiyama et al., 2007; Ziran, 2007). Da in den klinischen Studien zum Zeitpunkt der definitiven Osteosynthese nach Abschluss der Weichteilsanierung auf die Anlage von Bakterienkulturen verzichtet wurde (Allen et al., 2007; Aryan et al., 2007; Govender et al., 2002; O'Shaughnessy et al., 2008; Swiontkowski et al., 2006), kann weder eine qualitative noch semi-quantitative Aussage über im Defektbereich verbliebene Bakterien getroffen werden.

Zudem werden in der gängigen klinischen Praxis kolonisierte Implantate, als wahrscheinlicher Infektionsfokus entfernt (Patzakis et al., 1986; Patzakis und Zalavras, 2005). Govender et al., (2002) trugen diesem Umstand insofern Rechnung, indem der Verfahrenswechsel von externer Fixation zu Marknagelosteosynthese erst durchgeführt wurde, nachdem das Weichteilmanagement abgeschlossen war, und die Wunde für infektionsfrei befunden wurde. Ein für nicht bakteriell kontaminiert befundener Defekt senkt das Risiko einer Kolonisierung des verwendeten Osteosynthesematerials und beugt somit der Entstehung und Persistenz einer Knocheninfektion durch eine Fremdmaterialoberfläche vor (Akiyama et al., 2007; Ziran, 2007).

Chen et al., (2006 und 2007) die sowohl für BMP-2 als auch BMP-7 eine statistisch signifikante Osteogenese im infizierten Defektareal des Kaninchenfemurs histologisch und radiologisch nachwiesen, bestätigten mit ihrem Tiermodell, im Vergleich zu der vorliegenden Studie, den Nutzen einer in der gängigen klinischen Praxis obligaten Revisionsoperation mit ausgedehntem Débridement im Rahmen von etablierten knöchernen Infektionen (Govender et al., 2002; Mouzopoulos et al., 2011; Trampuz und Zimmerli, 2006). Darüber hinaus bestätigten sie die Verabreichung einer prolongierten systemischen Antibiotikatherapie, da es unter zusätzlicher Gabe von Ceftriaxon s.c. für vier Wochen zu einer weiter verstärkten Osteogenese kam, obwohl Ceftriaxon weder aktuell zur Therapie von Knocheninfektionen empfohlen wird, noch in Kombination gegeben wurde (Spellberg und Lipsky, 2012). Zudem entspricht auch die zeitlich begrenzte Gabe von vier Wochen nicht aktuellen Empfehlungen, die eine Anwendung über vier Wochen hinaus nahe legen (Rao et al., 2011).

Auch in der vorliegenden Studie konnte durch eine Antibiotikaphylaxe mit Ceftriaxon ein positiver Effekt auf die Infektionsentwicklung beobachtet werden. Entwickelte sich in der ersten Pilotstudie unabhängig von der Inokulationsdosis bei allen Tieren nach genannten klinischen, radiologischen und mikrobiologischen Kriterien eine Knocheninfektion, so wies bei 10^3 KBE in der zweiten Pilotstudie und zusätzlicher Gabe von Ceftriaxon (50 mg/kg Körpergewicht s.c.) für 14 Tage kein Tier aus der rhBMP-2- Gruppe und ein 1 Tier aus der Kontrollgruppe Zeichen einer Knocheninfektion auf. Aufgrund der geringen Gruppengrößen von nur 2 Tieren pro Gruppe besteht diesbezüglich nur eine geringe Aussagekraft, zumal bei tierexperimentellen Studien die zufällige individuelle Vulnerabilität der einzelnen Tiere dieses Ergebnis maßgeblich beeinflusst haben könnte.

4.5 Beeinflussende Faktoren

Verschiedene Faktoren könnten die Ergebnisse der vorliegenden Studie beeinflusst haben. Expression der BMP-Rezeptoren, Interaktion mit BMP-Antagonisten, Applikation mittels eines kollagenen Trägermaterials und die sich daraus ergebende Freisetzungskinetik, die gewählte rhBMP-2- Dosis, Frakturinstabilität, Angiogenese, systemische Antibiotikatherapie, Inokulationsdosis und die bakterielle Adhärenz mit Biofilmbildung auf dem Implantat zählen dazu.

Rezeptoren und Antagonisten von BMP-2

Für die Responsivität des Knochens für BMP-2 in unterschiedlichen Szenarien liegen komplementäre Ergebnisse vor. Darüber hinaus sind speziesspezifische Expressionsmuster bekannt, die die Transferierbarkeit präklinischer Daten auf klinische Beobachtungen einschränken. Kloen et al., (2002) berichteten von einer permanenten Expression von BMP-2 und kontinuierlicher Aktivität von BMPR- IA, BMPR- IB und BMPR- II bei humanen Pseudarthrosen und verzögerten Frakturheilungen. Hingegen war die Rezeptorexpression in einem Rattenmodell für atrophe Pseudarthrosen von BMP-2 im Vergleich zur physiologischen Frakturheilung statistisch signifikant geringer (Niikura et al., 2006). Von humanen Pseudarthrosen genommene Gewebeproben wiesen ebenfalls reduzierte BMP-2 Expressionen auf, die einen Mangel an endogenem BMP-2 suggerieren (Fajardo et al., 2009; Kwong et al., 2009). Die vermehrte Expression von BMPR- II in einem Rattenmodell für infizierte segmentale Femurdefekte konnte durch die Applikation von 200 µg rhBMP-2 noch signifikant gesteigert werden (Brick et al., 2009). Für die Expression der BMP-Rezeptoren IA und

IB werden im Rahmen von Knocheninfektionen in der Literatur keine Angaben gemacht. Erst eine ausreichende Expression der Typ-I Rezeptoren ermöglicht eine suffiziente Bindung von BMP-2 an BMPR- II und führt zu einer Osteogenese induzierenden Signalkaskade (Liu et al., 1995).

Die physiologische Frakturheilung sieht ein fragiles Gleichgewicht von BMPs und BMP-Antagonisten vor. Zur Expression von BMP-Antagonisten im Rahmen von Pseudarthrosen liegen komplementäre Ergebnisse vor. Neben einer verminderten Expression von BMP-Antagonisten bei atrophen Pseudarthrosen in einem Rattenmodell (Niikura et al., 2006) wurde eine unveränderte (Kwong et al., 2009) als auch gesteigerte Expression in Gewebeproben humaner Pseudarthrosen (Fajardo et al., 2009) nachgewiesen, die auf speziesspezifische Unterschiede hindeuten. Die genauen Regulationsmechanismen von BMPs und ihren Antagonisten für Pseudarthrosen sind weiterhin unbekannt. Gesichert scheint ein Missverhältnis. So konnten Defekte kritischer Größe der Calvaria durch Suppression von Noggin beschleunigt konsolidiert werden (Wan et al., 2007). In der Literatur gibt es bisher keine ausreichenden Ergebnisse, die eine mögliche Veränderung der Expression von BMP-Rezeptoren, der Bindungskinetik von BMPs an ihren Rezeptoren und Signaltransduktion für infizierte Frakturen, beschreiben. Die Frage inwieweit BMPs im Rahmen akuter Infektionen an osteogenetischem Potenzial einbüßen, kann im Moment noch nicht beantwortet werden (Allen et al., 2007).

Pharmakokinetik und Carrier

Erfolgreiche Pharmakotherapie setzt für gewisse Zeiträume entsprechende Wirkspiegel voraus. Unterdosierung führt zu verringerten bis ausbleibenden Effekten. Bei Überdosierung kann erwartete Wirkung von unerwünschten toxischen Nebenwirkungen negiert werden. Bedingt durch die geringe Halbwertszeit von 60-240 Minuten der Wachstumsfaktoren (Zapf et al., 1986; Zionchek et al., 1994) werden ausreichende lokale Wirkspiegel von BMPs nur durch Trägermaterialien erreicht (Schmidmaier et al., 2008). Die gute Biokompatibilität, Bioresorbierbarkeit und Formbarkeit sind Vorteile von Kollagen. Durch bovine Schwämme können Krankheiten übertragen und immunologische Abwehrreaktionen provoziert werden (Seeherman und Wozney, 2005). Kollagenschwämme werden dennoch als relativ sicher bewertet (Hiremath et al., 2009). Die Herstellung rekombinanter Schwämme ohne diese Nachteile stellt in Zukunft vermutlich eine Alternative dar (Haidar et al., 2009).

Die Wirkung von rhBMP-2 appliziert über einen Kollagenschwamm scheint speziespezifisch zu sein (Schmidmaier et al., 2002). Boden et al. (1999) wiesen daraufhin, dass der Kollagenschwamm für Fusionsmodelle in Kaninchen und Hunden geeignet ist, aber im Affenmodell einer posterolateralen Lendenwirbelkörperarthrodese versagte. Trotz gegenteiliger Beobachtungen (Azad et al., 2009; Chen et al., 2007; Glatt et al., 2009; Lee et al., 2010) könnte das veränderte Szenario einer akut infizierten Osteotomie in diesem Modell die Effektivität der Kombination rhBMP-2 und ACS beeinträchtigt haben. Die verwendete Konzentration von 2 mg/ml ist durch verschiedene Studien (Chen et al., 2006 und 2007) empirisch ermittelt worden. Wiemann et al., (2001) berichten für rhBMP-2 über eine halbmaximale Rezeptorsättigung von 0,8-2,5 µg/ml und eine vollständige Sättigung bei 8-25 µg/ml. Bei höheren rhBMP-2 Konzentrationen ist keine Zunahme der biologischen Effekte zu erwarten. Zum einen handelt es sich um *in vitro* Ergebnisse, zum anderen sind für Knocheninfektionen bisher keine publizierten *in vivo* Daten zur Bindungskinetik von BMP-2 an seine Rezeptoren verfügbar, so dass weder eine Unter- noch Überdosierung ausgeschlossen werden kann.

Vorausgesetzt der Schwamm konnte sich lange genug mit der rhBMP-2- Lösung vollsaugen (Friess et al., 1999), beeinflussen zahlreiche Umstände wesentlich die Freisetzungskinetik. Die Kompression des Schwammes durch den vom umgebenden Muskelgewebe ausgeübten Druck kann initial zu einer verstärkten unkontrollierten Freisetzung von rhBMP-2 führen (Kandziora et al., 2002; Martin et al., 1999). Die Aufnahmekapazität kollagener Schwämme ist pH- abhängig. Je niedriger der pH-Wert, desto weniger rhBMP-2 kann inkorporiert werden (Friess et al., 1999). Im sauren Milieu einer ausgedehnten Knochen- und Weichteilinfektion (Kalbitz und Baum, 2009) ist somit eine unkontrollierte Freisetzung denkbar. Exzessive lokale Konzentrationen wirken ihrerseits inhibierend auf die Osteogenese (Uludag et al., 2001) und steigern die Aktivität von Osteoklasten, so dass eine speziesspezifische Maximaldosis nicht überschritten werden sollte (Sampath et al., 1992; Sandhu et al., 1995; Valentin-Opran et al., 2002). Nach sieben Tagen ist noch ca. ein Drittel der inkorporierten Menge an rhBMP-2 im Schwamm enthalten (Li und Wozney, 2001). In gering vaskularisierten Bereichen scheint die lokale Konzentration schneller zu sinken als für eine adäquate Induktion der Osteogenese optimal wäre (Geiger et al., 2003). Für drittgradig offene Tibiafrakturen könnten sich Träger mit konstanter Freisetzung über längere Zeiträume als vorteilhaft erweisen, da Osteoblasten zudem auf Schwankungen des rhBMP-2 Spiegel mit verminderter Osteogenese reagieren (Katagiri et al., 1994).

Stämme von *Staphylococcus aureus* können über spezifische Oberflächenrezeptoren zur Bindung an Kollagen verfügen (Speziale et al., 1986). Die Kolonisierung des Kollagenschwammes könnte einerseits die Freisetzungskinetik von rhBMP-2 negativ beeinflusst haben und andererseits die Infektion bis zur vollständigen Resorption des Schwammes von dort aus unterhalten haben. In der klinischen Anwendung besteht weiterhin Uneinigkeit über Höhe der Dosis, Auswahl des Trägermaterials und die Veränderung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen im Kontext verschiedener Mikromilieus (Kanakaris et al., 2007).

Osteosynthese

In diesem Modell wurde die osteotomierte Tibia ohne Aufbohrung des Markkanals mit einer Kanüle als intramedulläres Implantat stabilisiert. Bis heute wird für offene Tibiafrakturen die aufgebohrte gegen die unaufgebohrte Marknagelung kontrovers diskutiert.

Nachteile der aufgebohrten Technik sind die Verlängerung der Operationszeit, höherer Blutverlust, thermische Schädigung der Kortikalis und Einschwemmung thrombogenen Materials (Hupel et al., 1998; Keating et al., 1997; Pape et al., 1992; Pape et al., 1996; Rhinelander 1974; Sturmer und Schuchardt, 1980; Wenda et al., 1988). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde ein beträchtlich höheres Infektionsrisiko angenommen. Die zusätzliche Schädigung der Vaskularität kann die Knochenvitalität gefährden. Darüber hinaus kann in den Blutkreislauf eingepresstes Knochenmark die Lungenfunktion beeinträchtigen. Offene Frakturen galten bis vor einigen Jahren als absolute Kontraindikation für aufgebohrte Marknagelung (Gustilo et al., 1990; Klemm und Borner, 1986), da 90% der Traumapatienten Fettemboli haben. Davon werden 1-5 % durch eine eingeschränkte Lungenfunktion manifest (Giannoudis et al., 2006b). Die Entwicklung pulmonaler Komplikationen scheint aber mehr abhängig von der Schwere der pulmonalen Verletzung als von der Art der Stabilisierung zu sein (Bone et al., 1998). Neuere Studien und Metaanalysen (Bhandari et al., 2001 und 2008a; Finkemeier et al., 2000; Keating et al., 1997), die zum Teil die 1200 Patienten umfassende S.P.R.I.N.T.- Studie (study to prospectively evaluate reamed intramedullary nails in patients with tibial fractures) von Bhandari et al. (2008b) einbeziehen, favorisieren für geschlossene Tibiaschaftfrakturen den aufgebohrten Marknagel und für offene Tibiaschaftfrakturen die Implantation eines unaufgebohrten Marknagels. Die aufgebohrte Marknagel ist bei offenen Tibiafrakturen tendenziell mit mehr Komplikationen, wie Reoperationen, Knocheninfektionen und postoperativen Kompartmentsyndromen assoziiert, als der in unaufgebohrter Technik implantierte Tibiamarknagel.

Auch in der vorliegenden Studie könnte die fehlende Verriegelung der in unaufgebohrter Technik eingebrachten Implantate bei unmittelbarer postoperativer Belastung der operierten Extremität die Entwicklung einer Instabilität begünstigt haben. Das intramedulläre Implantat sieht wegen seines geringen Außendurchmessers von 0,8 mm keine Möglichkeit zur Verriegelung vor. Trotz manueller Überprüfung ist eine subklinische Rotationsinstabilität möglich. Rattentibiae sind im Gegensatz zu menschlichen Tibiae diaphysär stärker antecurviert. Das erschwert nicht nur die Insertion, sondern reduziert auch den festen Kontakt des K-Drahtes. Wesentliche Kontaktflächen sind im Bereich der proximalen und distalen Tibiametaphyse. Diaphysär kann theoretisch eine übermäßige Bewegung der Knochenenden gegeneinander auftreten, so dass gebildeter Kallus den Knochenspalt nicht überbrücken kann. Eine hypertrophe Pseudarthrose entsteht (Den Boer et al., 2002; Frost, 1989; Krötz et al., 2004; Rüter und Mayr, 1999; Schweiberer et al., 1999). Besteht zusätzlich eine Infektion wird Knochen resorbiert. Resultat ist eine sekundäre Instabilität, die die Infektion aufrecht erhält und die Entwicklung einer infizierten Pseudarthrose vorantreibt (Den Boer et al., 2002; Worlock et al., 1994). Dieser *circulus vitiosus* aus Infektion und Instabilität kann in der Regel nur operativ durch Resektion infizierten fibrösen Ersatzgewebes und mechanischer Stabilisierung durchbrochen werden (Einhorn, 1999; Marsh, 1998; Rüter et al., 1999; Schweiberer et al., 1999).

Als Zeichen erhöhter Materialbeanspruchung bei mechanischer Instabilität zeigten die Röntgenbilder der infizierten Tiere zum Abschluss des Beobachtungszeitraumes nach 42 Tagen deutlich verformte Implantate. Da Röntgenbilder nur postoperativ und nach 42 Tagen angefertigt wurden, lässt sich nicht mehr feststellen, ob nach Implantation sich das Implantat zuerst gelockert und die Infektion begünstigt hat, oder die angehende Infektion durch Knochenresorption das Implantat gelockert hat. Möglich ist auch die Kombination von beidem.

Dieses Modell kann trotz manueller Prüfung auf Rotationsstabilität und postoperativer radiologischer Lagekontrolle des eingebrachten K-Drahtes keine absolute Fixation der zwei Knochenteile garantieren, insbesondere bei sofortiger Belastung der operierten Extremität. Ein *circulus vitiosus* aus Instabilität und Infektion könnte ebenfalls die Effekte von rhBMP-2 auf die Konsolidierung des knöchernen Defektes verschmälert haben. Eine unmittelbare Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Studie mit den Ergebnissen von Chen et al. (2006 und 2007), die über positive Effekte von BMPs auf die knöcherne Konsolidierung chronisch infizierter segmentaler Femurdefekte berichten, ist nicht gegeben. Diese Arbeitsgruppe verwendete statt eines intramedullären Kraftträgers eine Plattenosteosynthese. Darüber hinaus wurde analog

zur klinischen Routine infiziertes fibröses Ersatzgewebe reseziert und bei eingetretener Instabilität die Osteosynthese erneuert.

Rasterelektronenmikroskopische Bilder und die mikrobiologische Untersuchung für in dieser Studie verwendete intramedulläre Kraftträger ergab eine bakterielle Besiedlung über die gesamte Länge des Implantates. Das intramedulläre Implantat mag einen Leitschieneneneffekt und die Genese der Infektion akzeleriert haben. Carrier begrenzen die Effekte von Wachstumsfaktoren auf unmittelbar umgebendes Gewebe. Der Kollagenschwamm mit rhBMP-2 wurde diaphysär aufgebracht. Ferner ist es denkbar, dass nach vollständiger bakterieller Besiedlung des Implantates rhBMP-2 keine Fernwirkung auf die Knocheninfektion im metaphysären Bereich entwickelt hat und die Infektion von dort aus unterhalten wurde.

Implantat-assoziierte Knocheninfektion

Der Schlüssel einer Implantat-assoziierten Infektion liegt auf zellulärer Ebene. Sie entstehen als Resultat bakterieller Adhäsionen auf der Implantatoberfläche (Vacheethasanee und Marchant, 2000). Dies geschieht in zwei Phasen. In der ersten Phase binden die Bakterien innerhalb von zwei Stunden. Verantwortlich dafür sind Van-der-Waals-Kräfte und elektrostatische Anziehung. Nach vier bis fünf Stunden, in Phase 2, gehen die Bakterien durch spezifische chemische Reaktionen eine irreversible molekulare Bindung mit der Oberfläche des Implantates ein. Dies gelingt durch Polysaccharide und Adhäsine auf und innerhalb bakterieller Zellmembranen (An und Friedman, 1998). Einige Stämme besitzen die Fähigkeit, circa 24 Stunden nach irreversibler Bindung an das Implantat, Exopolysaccharide zu bilden. Diese Polysaccharide machen die Eigenschaften des Biofilms aus. Er bietet Schutz vor Antibiotika, Phagozyten, Antikörpern, (Vacheethasanee und Marchant, 2000) und kompromittiert die frakturtypischen Revaskularisationsvorgänge durch den Wirt (An und Friedman, 1998). Eine vergleichbare bakterizide Wirkung von Antibiotika würde eine, für den Wirtsorganismus nicht mehr tolerierbare, Erhöhung der Dosis um das 1000-fache erfordern (Smith, 2005). Nach Implantation konkurriert die Osteointegration des Synthesematerials mit der bakteriellen Adhäsion auf der Oberfläche (Gristina, 1987; Gristina et al., 1988).

Langfristig erfolgreiche Osteointegration und Knochenheilung gelingt nur, wenn in einem Zeitkorridor von circa sechs Stunden nach Implantation die Biofilmbildung verhindert wird (Poelstra et al., 2002). RhBMP-2 besitzt keine bakterizide Wirkung. Die signifikant geringeren Infektionsraten (Govender et al., 2002) durch rhBMP-2/ACS

lassen sich folgendermaßen erklären. BMPs wirken chemotaktisch, auch auf Monozyten. Monozyten phagozytieren Bakterien und initiieren immunologische Abwehrreaktionen durch Rezeptorkontakt mit T- und B- Zellen. Monozyten sind durch Sezernierung zahlreicher Wachstumsfaktoren an der Angiogenese beteiligt (Termaat et al., 2005). Zudem werden Osteoblasten angeregt Interleukin 6 zu produzieren (Zheng et al., 1994). IL-6 ist der stärkste bekannte Stimulus zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber, zu denen auch das C-reaktive Protein (CRP) gehört. CRP ist ein Opsonin und Opsonine sind integraler Bestandteil des unspezifischen Immunsystems. Die Bindung an bestimmte häufige extrazelluläre Polysacchariddomänen von Bakterien aktiviert das alternative Komplementsystem und führt zur Lyse der Zelle (Tillet und Francis, 1930). In der Literatur sind bisher noch keine Studien zur Quantifizierung der BMP-2 vermittelten antimikrobiellen Effekte vorhanden.

Ein weiteres Wirkprinzip ist die parallel zur verstärkten Osteogenese gesteigerte Angiogenese. BMP-2 erhöht dosisabhängig die Expression von VEGF-A in Osteoblasten (Deckers et al., 2002). Osteogenese ist also obligat mit Angiogenese gekoppelt (Deckers et al., 2002; Street et al., 2002). Die Angiogenese ist aber nicht ausschließlich an vitale knochenspezifische Zellen geknüpft (Moutsatsos et al., 2001; Ramoshebi und Ripamonti, 2000). Auch Endothelzellen werden dazu aktiviert (Langenfeld und Langenfeld, 2004). Frühzeitige Revaskularisierung bedeutet theoretisch erhöhte Antibiotikakonzentrationen, Sauerstoffpartialdrücke, verbessertes Substratangebot und verstärkte Chemotaxis über die neugebildeten Gefäße. Folge wäre eine effektivere Infektionseradikation und beschleunigte Osteogenese durch bessere Oxygenierung (Allen et al., 2007). Dies könnte, neben dem radikalen Wunddébridement, die bereits erwähnte vermehrte Knochenbildung im Osteotomiespalt eines infizierten segmentalen Femurdefektes, wenn zusätzlich rhBMP-2 oder rhBMP-7 appliziert wurde (Chen et al., 2006 und 2007), erklären.

Anderes Osteosyntheseverfahren und zum Teil anderer Wachstumsfaktor mit anderem Dosis-Wirkungsprofil machen direkte Vergleiche mit den Ergebnissen dieser Studie unmöglich. Bemerkenswert ist, dass sowohl durch rhBMP-2, als auch rhBMP-7, keine einzige knöcherne Konsolidierung zu erzielen war. Dennoch ist die Veränderung des osteogenetischen Potenzials von BMP-2 und BMP-7 durch eine akute Infektion möglicherweise unterschiedlich stark beeinflusst.

Eine plausible Erklärung für die Ergebnisse dieser Studie stellt die fulminante Entwicklung der Infektion dar. Staphylokokken können innerhalb von 24 Stunden eine

maximalst mögliche Koloniezahl auf einer Implantatoberfläche erreichen (Barth et al., 1988) und so frühzeitig die Effekte der durch rhBMP-2 verstärkten Angiogenese und Osteogenese negiert haben. Dieser Umstand wird vermutlich durch die hohe Inokulationsdosis von 10^4 KBE in der Hauptstudie verstärkt, die auch um ethischen Ansprüchen gerecht zu werden, einen Kompromiss zwischen sicherer Induktion der Infektion zur Reduktion der Anzahl benötigter Tiere und Beurteilbarkeit der Effekte von rhBMP-2 darstellt. Durch das in der Klinik obligate Débridieren und Spülen der Wunde, erscheint im Vergleich zu dieser Studie die verwendete Inokulationsdosis von 10000 KBE eines *Staphylococcus aureus* Stammes verhältnismäßig hoch.

Die gewählte systemische Antibiose mit Ceftriaxon gewährleistet eine gewisse Vergleichbarkeit mit anderen präklinischen BMP- Studien (Chen et al., 2006 und 2007) – entspricht aber nicht den anerkannten EAST- Richtlinien zur Infektionsprophylaxe bei offenen Tibiafrakturen. Empfohlen wird für kontaminierte drittgradig offene Frakturen ein Cephalosporin der zweiten Generation (z.B. Cefuroxim) gegen grampositive und ein Aminoglykosid (z.B. Gentamicin) gegen gramnegative Bakterien. Die antimikrobielle Potenz dieser Kombination wird durch den synergistischen Wirkmechanismus noch verbessert. Zudem wirken Aminoglykoside gegen Penicillin-, Cephalosporin- und Methicillin-resistente Staphylokokken. Für Ceftriaxon als ein Drittgeneration- Cephalosporin besteht wegen zu geringer Potenz gegen grampositive Kokken keine Empfehlung (Hoff et al, 2011; Luchette et al., 1998). Es bleibt spekulativ, ob unter einer Kombinationsantibiotikaprophylaxe die Effekte von rhBMP-2 mehr zum Tragen gekommen wären. Eine Differenzierung zwischen Antibiotika- und BMP-2-Effekt wäre bei erfolgreicher knöcherner Defektheilung und Abwesenheit von Infektionszeichen problematisch, und ginge darüber hinaus zu Lasten der Vergleichbarkeit mit anderen tierexperimentellen Studien (Chen et al., 2006 und 2007).

Hochrasanztraumata, die zu offenen Frakturen mit ausgeprägten Weichteilschäden führen, sind besonders abhängig von einer Revaskularisierung (Dickson et al., 1994; Dickson et al., 1995; Sluzalek et al., 2004). Eine durch bakterielle Infektion ineffektive Revaskularisierung behindert die Osteogenese und mündet in ausbleibender Frakturheilung (Patzakis und Zalavras, 2005). Ein Großteil der humanen mesenchymalen Stammzellen ist im Gewebe um den Knochen lokalisiert (Bianco und Riminucci, 2001; Jaiswal et al., 1997; Nakase et al., 1994; Sekiya et al., 2002; Urist, 1965). Die Destruktion des Weichteilmantels könnte auch in dieser Studie zu einem Mangel an rekrutierbaren Stammzellen geführt haben und das Ausbleiben einer effektiven Osteoinduktion erklären (Kwong und Harris, 2008). Dies wird durch die

Tatsache verstärkt, dass anhaltende Hypoxie zu einer Reduktion des osteogenetischen Potentials mesenchymaler Stammzellen führt (Potier et al., 2007).

Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten in dieser Studie 200 µg rhBMP-2, in einer Konzentration von 2 mg/ml, im Vergleich zur rhBMP-2- freien Behandlung, weder das klinische und radiologische Ergebnis bakteriell kontaminierter Tibiaschaftosteotomien verbessern, noch statistisch signifikant die biomechanische Torsionssteifigkeit erhöhen. Die Prävention einer Infektion schlug fehl. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion der Bakterienlast pro Gramm Knochen durch rhBMP-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ungenaue Kenntnis der zellulären Regulationsmechanismen zwischen BMP-2, seinen Rezeptoren und Antagonisten, Unsicherheiten hinsichtlich Dosierung, Trägermaterial und Freisetzungskinetik, sowie möglicherweise insuffiziente Fixierung der Knochenenden können im Rahmen einer sich entwickelnden Knochen- und Weichteilinfektion zusätzlich das Outcome negativ beeinflusst haben. Dennoch scheint die anhaltende Infektion, in Unkenntnis der genauen zellulären Mechanismen, die osteoinduktiven Effekte von rhBMP-2 gehemmt zu haben. Fazit dieser Studie: Für die optimale klinische Anwendung von rhBMP-2 sind bakterienfreie Operationsfelder anzustreben.

4.6 Ausblick

Offene Frakturen langer Röhrenknochen sind immer noch mit einer hohen Komplikationsrate assoziiert. Besonders schwerwiegend sind Infektionen, die zu infizierten Pseudarthrosen führen. Weitere Eingriffe sind dann meist nicht zu verhindern. Ultima Ratio bleibt bei vitaler Bedrohung und nicht beherrschbaren Knochen- und Weichteilinfektionen die Amputation. Ziel muss es sein, Infektionen bei offenen kontaminierten Frakturen zu verhindern, nicht nur um Morbidität und Mortalität zu senken, sondern auch um medizinische Kosten zu reduzieren und volkswirtschaftlichen Schaden abzuwenden. Eine Möglichkeit stellen, rekombinant hergestellte, körpereigene Wachstumsfaktoren dar, zu denen auch BMP-2 gehört. Sie spielen eine wichtige Rolle bei komplexen Vorgängen der Reparatur und Regeneration von Geweben und können essentielle Prozesse der Knochenbruchheilung, wie Chemotaxis, Angiogenese, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose beschleunigen.

In dieser Studie ergaben sich keine Vorteile für die adjuvante Anwendung von rhBMP-2 bei kontaminierten Tibiaschaftosteotomien. Vom biomedizinischen Standpunkt besteht die dringende Notwendigkeit die zellulären Regulationsmechanismen der Knochenheilung genauer zu verstehen, um die Erkenntnisse pharmakologisch zu nutzen. Zudem müssen die Ursachen für mangelnde Responsivität von BMPs im Rahmen akuter Infektionen aufgeklärt werden.

Therapeutischer Nutzen könnte auch in der Antagonisierung negativer Rückkopplungsschleifen liegen, mit dem Ziel einer bewussten Hyperstimulation reparativer Vorgänge. So könnte ein Marknagel mit der Kombination rhBMP-2, VEGF, IGF-I und BMP-Antagonistinhibitor beschichtet sein. Auf den Kollagencarrier kann dabei verzichtet werden. Zudem stellt die Entwicklung neuer Oberflächen mit anderen physikalischen Eigenschaften eine Möglichkeit dar, die initiale unspezifische Bindung von Bakterien zu verhindern. Darüber hinaus ist das Osteosyntheseprinzip der intramedullären Stabilisierung noch nicht ausgereizt. Erste vielversprechende Ergebnisse liegen für intramedulläre Fixatoren vor, die das Prinzip des Marknagels mit dem der winkelstabilen Platte kombinieren (Horn et al., 2009). Langfristiges Ziel ist die Frakturheilung durch ein breit gefächertes Angebot verschiedener Wachstumsfaktoren und Osteosyntheseverfahren dem klinischen Szenario individuell angepasst zu stimulieren. Das Fernziel ist ein „biofunktionalisiertes“ Osteosynthesematerial mit antibakteriellen, osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften zur Reduktion von Komplikationen und Verbesserung der Behandlungsergebnisse von Patienten mit offenen Unterschenkelfrakturen.

5 Zusammenfassung

Infektionen und insbesondere infizierte Pseudarthrosen sind mit erheblich reduzierter Lebensqualität und enormen Kosten für die Gesundheitssysteme verbunden und gehören zu den herausforderndsten Krankheitsbildern in Orthopädie und Unfallchirurgie.

In vivo Studien sind ein entscheidender Schritt um neue Strategien zur Prophylaxe und Behandlung von infizierten Pseudarthrosen zu entwickeln. Das Ziel dieser Arbeit ist die Beurteilung der Effekte von rekombinantem humanen Bone Morphogenetic Protein 2 (rhBMP-2) auf die Infektentwicklung und Knochenbruchheilung, im Rahmen eines Tiermodells, bei Tibiaschaftosteotomien, die mit einem *Staphylococcus aureus* Stamm kontaminiert wurden.

Dazu wurden die Rattentibiae osteotomiert, mit einem intramedullären Implantat stabilisiert und anschließend mit einem biofilmbildenden *Staphylococcus aureus* Stamm, bezeichnet als EDCC 5055 (Eugen Domann Culture Collection, Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Gießen) kontaminiert. Nach 42 Tagen wurde die klinische Untersuchung, Bildgebung in Form von Röntgen und Mikro-CT, mikrobiologische Auswertung, biomechanische Testung und Rasterelektronenmikroskopie zur Beurteilung von Infektion und Knochenheilung durchgeführt.

Die Pilotstudie diente zur Etablierung des Tiermodells mittels drei verschiedener Inokulationsdosen (10^3 , 10^5 und 10^7 koloniebildende Einheiten (KBE)) ohne oder mit systemischer Antibiotikaphylaxe (Ceftriaxon; 50 mg/kg Körpergewicht s.c.), so dass in der Hauptstudie unter Verwendung von 10^4 KBE zur Untersuchung der Effekte von rhBMP-2 zuverlässig eine diaphysäre Implantat-assoziierte infizierte Tibiapseudarthrose induziert wurde.

In der Hauptstudie erhielten die Tiere der Versuchsgruppe additiv einen mit 200 µg rhBMP-2, in einer Konzentration von 2 mg/ml, versetzten absorbierbaren Kollagenschwamm, der direkt auf die kontaminierte Osteotomie appliziert wurde. In Analogie zu ähnlichen experimentellen Studien wurde eine prolongierte systemische Antibiotikaphylaxe mit Ceftriaxon über 14 Tage durchgeführt.

Nach 42 Tagen wiesen 90,9% der Tiere beider Gruppen deutliche klinische und radiologische Zeichen einer infizierten Pseudarthrose auf. Im Mikro-CT bestätigten sich eindrucksvoll Knochendestruktionen, Knochensequester, Knochensequesterformationen und kortikale Lysen als Zeichen der infizierten Pseudarthrose. In der rhBMP-2- Gruppe war die Bakterienlast statistisch signifikant

geringer ($1,6 \cdot 10^4$ KBE/g Knochen) als in der Kontrollgruppe ($28,4 \cdot 10^4$ KBE/g Knochen; $p=0,03$). In der Rasterelektronenmikroskopie zeigten sich Biofilminformationen über die gesamte Länge der explantierten Marknägel. Für die biomechanische Testung ergab sich keine statistisch signifikant erhöhte Torsionssteifigkeit für die Tiere mit rhBMP-2 im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend verbesserte rhBMP-2 in dieser Studie nicht statistisch signifikant die klinischen, radiologischen und biomechanischen Ergebnisse, mit *Staphylococcus aureus*, kontaminierter und osteotomierter Rattentibiae. Die persistierende Infektion scheint die osteoinduktiven Effekte von rhBMP-2 supprimiert zu haben. Weitere Forschung ist nötig, um die zellulären Interaktionsmechanismen von BMP-2 zu untersuchen und seine klinische Anwendung, beispielsweise im Rahmen akuter Infektionen, zu verbessern. Deshalb lautet das Fazit dieser Studie, dass für die klinische Anwendung von rhBMP-2 ein bakterienfreier Operationssitus anzustreben ist.

6 Summary

Infections and especially infected nonunions are one of the most challenging situations in orthopaedic and orthopaedic trauma surgery with tremendous impact on the patients' quality of life and enormous costs for the health care system.

In vivo studies are a decisive step for developing new strategies to improve prophylaxis and treatment of infected nonunions. The aim of this study was to assess the effects of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) on the infection development and fracture healing in an animal model for tibial shaft osteotomies contaminated with a *Staphylococcus aureus*.

The tibia midshaft of rats was osteotomized and stabilized with an intramedullary implant followed by contamination of the osteotomy with a biofilm producing *Staphylococcus aureus*, termed EDCC 5055 (Eugen Domann Culture Collection, Institute of Medical Microbiology, University Hospital Gießen, Germany). After 42 days clinical examination, X-ray, micro-CT scanning, microbiological evaluation, biomechanical testing and scanning electron micrography were performed to assess infection and bone healing.

The pilot study served to establish the animal model using three different bacteria inoculation doses (10^3 , 10^5 and 10^7 colony forming units (CFUs)) with or without systemic antibiotic prophylaxis (Ceftriaxon; 50 mg/kg body weight s.c.) leading reliably to an implant-associated infected diaphyseal nonunion of the tibia when 10^4 CFUs were used in the main study to assess the effects of rhBMP-2.

In the main study the animals of the experimental group received additively 200 µg of rhBMP-2, in a concentration of 2 mg/ml, on an absorbable collagen sponge which was applied directly to the contaminated osteotomy. According to similar studies, a prolonged systemic antibiotic prophylaxis with Ceftriaxone was administered for 14 days.

After 42 days, 90.9% of the animals in both groups showed clear clinical and radiological signs of infected nonunions. Micro-CT scans confirmed bone destruction, bone sequestrs, bone sequester formations and cortical lysis as an impressive sign for infected nonunions. In the rhBMP-2 group the bacterial load was statistically significant lower ($1.6 \cdot 10^4$ CFUs/g bone) than in the control group ($28.4 \cdot 10^4$ CFUs/g bone; $p=0.03$). Scanning electron microscopy showed biofilm formations on the surface over the entire length of the explanted nails. Torsional stiffness testing revealed no

statistical significant increased mechanical resistance for animals of the rhBMP-2 group compared to the control group.

In summary, rhBMP-2 did not improve statistically significant the clinical, radiological and biomechanical results in this study for *Staphylococcus aureus* contaminated tibial shaft osteotomies in rats. The ongoing infection seemed to hamper the osteoinductive effects of rhBMP-2. Further research should focus on the cellular interactions of BMP-2 to improve its use in clinical applications like acute infections. The conclusion of this study is to achieve bacteria-free surgical sites for the use of rhBMP-2.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACS	Absorbable Collagen Sponge
API	Analytischer-Profil-Index
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
a. -p.	anterior-posterior
ATLS	Advanced Life Trauma Support
BESST	BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma
BHI	brain heart infusion
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein 2
BV	bone volume
ca.	circa
CRP	C-reaktives Protein
EDCC	Eugen Domann Culture Collection
G	Gauge
GDF	Growth and Differentiation Factor
IGFs	insulin-like growth factors
Ihh	Indian hedgehog
IL-6	Interleukin 6
KBE	koloniebildende Einheiten
KNS	Koagulase- negative Staphylokokken
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
K-Draht	Kirschner- Draht
Konz.	Konzentration
kV	Kilovolt
Nm	Newtonmeter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
ms	Millisekunden
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCs	mesenchymale Stammzellen
MSCRAMM	microbial surface components recognising adhesive matrix molecules
PRDC	protein related to Dan and Cerebrus
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rhBMP-2	rekombinantes humanes Bone Morphogenetic Protein 2

rhBMP-7	rekombinantes humanes Bone Morphogenetic Protein 7
S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
s.c.	subkutan
TGF- β	transforming growth factor
TV	tissue volume
upm	Umdrehungen pro Minute
USAG	uterine sensitization associated gene
VEGF	vascular endothelial growth factor
° C	Grad Celsius
μ CT	Micro- Computertomographie
μ m	Mikrometer

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung offener Tibiaschaftfrakturen	S. 2
Abbildung 2: Mitglieder der TGF- β -Superfamilie	S. 15
Abbildung 3: Signaltransduktion via BMP- Rezeptoren	S. 16
Abbildung 4: Mögliche Quellen zur Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen	S. 17
Abbildung 5: Effekte von BMPs	S. 18
Abbildung 6: Präparation des zurechtgeschnitten Kollagenschwammes	S. 28
Abbildung 7a, b: Operationstechnik	S. 29/30
Abbildung 8: Postoperative seitliche Röntgenaufnahme	S. 31
Abbildung 9: Seitliche und a.-p.- Röntgenaufnahme	S. 33
Abbildung 10: Tibia in μ CT	S. 34
Abbildung 11: Zermahlen der und ausplattieren der Tibia	S. 35
Abbildung 12: Rasterelektronenmikroskopie eines K-Drahtes	S. 36
Abbildung 13: Biomechanische Testung	S. 38
Abbildung 14: Beurteilung der Knochen- und Weichteilinfektion	S. 40
Abbildung 15: Postoperative Röntgendiagnostik	S. 41
Abbildung 16: Mikrobiologische Auswertung	S. 41
Abbildung 17: Rasterelektronenmikroskopie	S. 42
Abbildung 18: Beurteilung der Infektion in der Hauptstudie	S. 45
Abbildung 19: Körpergewichtsentwicklung	S. 46
Abbildung 20: Röntgenbilder der Hauptstudie	S. 47
Abbildung 21: μ CT- Scans der Hauptstudie	S. 48
Abbildung 22: Resultate der bebrüteten BHI-Agarplatten	S. 49
Abbildung 23: geometrische Mittelwerte KBE/g Knochen	S. 50
Abbildung 24: REM eines sterilen und eines kolonisierten Implantates	S. 51
Abbildung 25: Biomechanische Torsionssteifigkeit	S. 52

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation offener Frakturen nach Gustilo und Anderson	S. 1
Tabelle 2: Design des ersten Pilotstudienteils	S. 26
Tabelle 3: Design des zweiten Pilotstudienteils	S. 26
Tabelle 4: Hauptstudiendesign	S. 26
Tabelle 5: Ergebnis der 2. Pilotstudie	S. 40
Tabelle 6: Übersicht über die Auswertung der Hauptstudie	S. 44
Tabelle 7: Übersicht der klinischen Ergebnisse der Hauptstudie	S. 44
Tabelle 8: Ergebnisse der μ CT- Scans	S. 48
Tabelle 9: Koloniebildende Einheiten pro g Knochen	S. 50

10 Literaturverzeichnis

- Abe, Etsuko (2006): Function of BMPs and BMP antagonists in adult bone. In: Annals of the New York Academy of Sciences (1068), S. 41-53.
- Ahlers, J.; von Issendorf, W.D. (1992): Häufigkeiten und Ursachen von Fehlstellungen nach Unterschenkelnagelungen. In: Unfallchirurgie (18), S. 31-36.
- Akiyama, H.; Torigoe, R.; Arata, J. (1997): Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from impetigo and furuncle: role of fibrinogen and fibrin. In: Journal of dermatological science (16), S. 2-10.
- Albrektsson, T.; Johansson, C. (2001): Osteoinduction, osteoconduction and osteointegration. In: European spine journal: official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society (10 Supplement 2), S. 96-101.
- Allen, R. T.; Lee, Y. P.; Stimson, E.; Garfin, S. R. (2007): Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in the treatment of pyogenic vertebral osteomyelitis. In: Spine (32), S. 2996-3006.
- Alt, V.; Bitschnau, A.; Osterling, J.; Sewing, A.; Meyer, C.; Kraus, R.; Meissner S. A.; Wenisch S.; Domann E.; Schnettler, R. (2006): The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. In: Biomaterials (27), S. 4627-4634.
- Alt, V.; Lips, K.S.; Henkenberens, C.; Muhrer, D.; Cavalcanti-Garcia, M.; Sommer, U.; Thormann, U.; Szalay, G.; Heiss, C.; Pavlidis, T.; Domann, E.; Schnettler, R. (2011): A new animal for implant-related infected non-unions after intramedullary fixation of the tibia in rats with fluorescent in situ hybridization of bacteria in bone infection. In: Bone (48), S. 1146-1153.
- American College of Surgeons Committee on Trauma (2008): ATLS: Advanced Trauma Life Support for Doctors. Student course manual, ed. 8. Chicago, IL, American College of Surgeons.
- An, Y. H.; Kang, Q. K.; Arciola, C. R. (2006): Animal models of osteomyelitis. In: The International journal of artificial organs (29), S. 407-420.
- Anglen, J.O. (2001): Wound irrigation in musculoskeletal injury. In: The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons (9), S. 219-226.
- Aryan, Henry E.; Lu, Daniel C.; Acosta, Frank L., JR; Ames, Christopher P. (2007): Corpectomy followed by the placement of instrumentation with titanium

- cages and recombinant human bone morphogenetic protein-2 for vertebral osteomyelitis. In: *Journal of neurosurgery. Spine* (6), S. 23-30.
- Asahina, I.; Watanabe, M.; Sakurai, N.; Mori, M.; Enomoto, S. (1997): Repair of bone defect in primate mandible using a bone morphogenetic protein (BMP)-hydroxyapatite-collagen composite. In: *Journal of medical and dental sciences*, (44), S. 63-70.
 - Attal, R.; Blauth, M. (2010): Unaufgebohrte Marknagelung. In: *Der Orthopäde*, (39), S. 182-191.
 - Azad, V.; Breitbart, E.; Al-Zube, L.; Yeh, S.; O'Connor, J. P.; Lin, S. S. (2009): rhBMP-2 enhances the bone healing response in a diabetic rat segmental defect model. In: *Journal of orthopaedic trauma* (23), S. 267-276.
 - Bach, A. W.; Hansen, S. T. Jr (1989): Plates versus external fixation in severe open tibial shaft fractures. A randomized trial. In: *Clinical orthopaedics and related research*, (241), S. 89-94.
 - Barradas, A. M.; Yuan, H.; van Blitterswijk, C. A.; Habibovic, P. (2011): Osteoinductive materials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. In: *European cells & materials* (21), S. 407-429.
 - Barth, E.; Myrvik, Q. M.; Wagner, W.; Gristina, A. G. (1989): In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. In: *Biomaterials* (10), S. 325-328.
 - Beardi, J.; Hessman, M.; Hansen, M.; Rommens, P.M. (2008): Operative treatment of tibial shaft fractures: a comparison of different methods of primary stabilisation. In: *Archives of orthopaedic trauma surgery* (128), S. 709-715.
 - Bessho, K.; Kusumoto, K.; Fujimura, K.; Konishi, Y.; Ogawa, Y.; Tani, Y.; Iizuka, T. (1999): Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein. In: *The British journal of oral & maxillofacial surgery* (37), S. 2-5.
 - Beveridge, T. J.; Makin, S. A.; Kadurugamuwa, J. L.; Li, Z. (1997): Interactions between biofilms and the environment. In: *FEMS microbiology reviews* (3-4), S. 291-303
 - Bhandari, M.; Guyatt, G. H.; Swiontkowski, M. F.; Schemitsch, E. H. (2001): Treatment of open fractures of the shaft of the tibia. In: *The Journal of bone and joint surgery* (83), S. 62-68.
 - Bhandari, M.; Zlowodzki, M.; Tornetta, P. 3rd.; Schmidt, A.; Templeman, D. C. (2005): Intramedullar nailing following external fixation in femoral and tibial shaft fractures. In: *Journal of orthopaedic trauma* (19), S. 140-144.
 - Bhandari, M.; Guyatt, G.; Tornetta, P. 3rd; Schemitsch, E. H.; Swiontkowski, M.; Sanders, D.; Walter, S. D. (2008a): Randomized trial of reamed and unreamed

intramedullary nailing of tibial shaft fractures. In: The Journal of bone and joint surgery (90), S. 2567-2578.

- Bhandari, M.; Guyatt, G.; Tornetta, P. 3rd; Schemitsch, E. H.; Swiontkowski, M.; Sanders, D.; Walter, S. D. (2008b) Study to prospectively evaluate reamed intramedullary nails in patients with tibial fractures (S.P.R.I.N.T.): study rationale and design. In: BMC musculoskeletal disorders (9), S. 91.
- Bhattacharyya, T.; Mehta, P.; Smith, M., Pomahac, B. (2008): Routine use of wound vacuum-assisted closure does not allow coverage delay for open tibia fracture. In: Plastic and reconstructive surgery (121), S. 1263-1266.
- Bianco, P.; Riminucci, M. (2001): Stem cells in medicine. In: Recenti progressi in medicina, (92), S. 251-256.
- Blick, S. S.; Brumback, R. J.; Poka, A.; Burgess, A. R.; Ebraheim, N. A. (1986): Compartment syndrome in open tibial fractures. In: The journal of bone and joint surgery, (68), S. 1348-1353.
- Boden, S. D.; Martin, G. J., JR; Morone, M. A.; Ugbo, J. L.; Moskovitz, P. A. (1999): Posterolateral lumbar intertransverse process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite-tricalcium phosphate after laminectomy in the nonhuman primate. In: Spine (Jg. 24), S. 1179-1185.
- Boden, S. D.; Zdeblick, T. A.; Sandhu, H. S.; Heim, S. E. (2000): The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. In: Spine, (25), S. 376-381.
- Bone, L. B.; Kassman, S.; France, J. (1994): Prospective study of union rate of tibial fractures treated with locked, unreamed intramedullary nails. In: Journal of orthopaedic trauma (8), S. 45-49.
- Bone, L. B.; Anders, M. J.; Rohrbacher, B. J. (1998): Treatment of femoral fractures in the multiply injured patient with thoracic injury. In: Clinical orthopaedics and related research (347), S. 57-61.
- Bostrom, M.; Lane, J. M.; Tomin, E.; Browne, M.; Berberian, W.; Turek, T. et al. (1996): Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. In: Clinical orthopaedics and related research (327), S. 272-282.
- Bostrom, M. P.; Camacho, N. P. (1998): Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. In: Clinical orthopaedics and related research (355 Supplement), S. S274-282.
- Bostrom, M. P.; Lane, J. M.; Berberian, W. S.; Missri, A. A.; Tomin, E.; Weiland, A. et al. (1995): Immunolocalization and expression of bone morphogenetic

- proteins 2 and 4 in fracture healing. In: *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, (13), S. 357-367.
- Bostrom, M. P.; Saleh, K. J.; Einhorn, T. A. (1999): Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. In: *The Orthopedic clinics of North America* (30), S. 647-658.
 - Bouxsein, M. L.; Turek, T. J.; Blake, C. A.; D'Augusta, D.; Li, X.; Stevens, M. et al. (2001): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* (83-A) S. 1219-1230.
 - Boyne, P. J.; Marx, R. E.; Nevins, M.; Triplett, G.; Lazaro, E.; Lilly, L. C. et al. (1997): A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. In: *The International journal of periodontics & restorative dentistry* (17), S. 11-25.
 - Brick, K. E.; Chen, X.; Lohr, J.; Schmidt, A. H.; Kidder, L. S.; Lew, W. D. (2009): rhBMP-2 modulation of gene expression in infected segmental bone defects. In: *Clinical orthopaedics and related research* (467), S. 3096-3103.
 - Bramlage, C. P.; Haupl, T.; Kaps, C.; Bramlage, P.; Muller, G. A.; Strutz, F. (2005): [Bone morphogenetic proteins in the skeletal system]. In: *Zeitschrift fur Rheumatologie* (64), S. 416-422.
 - Burkus, J. K.; Gornet, M. F.; Dickman, C. A.; Zdeblick, T. A. (2002a): Anterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2 with tapered interbody cages. In: *Journal of spinal disorders & techniques* (15), S. 337-349.
 - Burkus, J. K.; Transfeldt, E. E.; Kitchel, S. H.; Watkins, R. G.; Balderston, R. A. (2002b): Clinical and radiographic outcomes of anterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2. In: *Spine* (27) S. 2396-2408.
 - Burkus, J. K.; Heim, S. E.; Gornet, M. F.; Zdeblick, T. A. (2003): Is INFUSE bone graft superior to autograft bone? An integrated analysis of clinical trials using the LT-CAGE lumbar tapered fusion device. In: *Journal of spinal disorders & techniques* (16), S. 113-122.
 - Buxton, T. B.; Travis, M. T.; O'Shea, K. J.; McPherson, J. 3rdC; Harvey, S. B.; Plowman, K. M.; Walsh, D. S. (2005): Low-dose infectivity of *Staphylococcus aureus* (SMH strain) in traumatized rat tibiae provides a model for studying early events in contaminated bone injuries. In: *Comparative medicine* (55), S. 123-128.
 - Canalis, E. (1994): Skeletal growth factors and aging. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* (78), S. 1009-1010.

- Centrella, M.; McCarthy, T. L.; Canalis, E. (1989): Effects of transforming growth factors on bone cells. In: *Connective tissue research* (20), S. 267-275.
- Chapman, M. W.; Olson, S. A (1996): Open fractures. In: Rockwood, C. A., Green, D. P.; Buchholz, R. W.; Heckman J. D. (Hrsg.). *Rockwood and Green's fractures in adults*, 4th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia: S. 305-352.
- Chen, X.; Schmidt, A. H.; Mahjouri, S.; Polly, D. W., JR; Lew, W. D. (2007): Union of a chronically infected internally stabilized segmental defect in the rat femur after debridement and application of rhBMP-2 and systemic antibiotic. In: *Journal of orthopaedic trauma* (21), S. 693-700.
- Chen, X.; Schmidt, A. H.; Tsukayama, Dean T.; Bourgeault, Craig A.; Lew, W. D. (2006): Recombinant human osteogenic protein-1 induces bone formation in a chronically infected, internally stabilized segmental defect in the rat femur. In: *The journal of bone and joint surgery. American volume* (88), S. 1510-1523.
- Cheng, H.; Jiang, W.; Phillips, F. M.; Haydon, R. C.; Peng, Y.; Zhou, L. et al. (2003): Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). In: *The Journal of bone and joint surgery* (85-A), S. 1544-1552.
- Chubinskaya, S.; Kuettner, K. E. (2003): Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* (35), S. 1323-1340.
- Cole, J. D.; Ansel, L. J.; Schwartzberg, R. (1995): A sequential protocol for management of severe open tibial fractures. In: *Clinical orthopaedics and related research* (315), S.84-103.
- Cole. J. D. (1998): Intramedullary fixation of proximal tibia fractures. In: *Techniques in orthopaedics* (13), S. 27-37
- Cook, S. D.; Baffes, G. C.; Wolfe, M. W.; Sampath, T. K.; Rueger, D. C.; Whitecloud, T. S. 3rd (1994): The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. In: *The journal of bone and joint surgery. American volume* (76), S. 827-838.
- Cook, S. D.; Wolfe, M. W.; Salkeld, S. L.; Rueger, D. C. (1995): Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. In: *The journal of bone and joint surgery. American volume* (77), S. 734-750.
- Court-Brown, C. M.; Christie, J.; McQueen, M. M. (1990): Closed intramedullary tibial nailing. Its use in closed and type I open fractures. In: *The Journal of Bone and Joint Surgery* (72), S. 605-611.

- Court-Brown, C. M.; McQueen, M. M.; Quaba, A. A.; Christie, J. (1991): Locked intramedullary nailing of open tibial fractures. In: *The Journal of bone and joint surgery* (73), S. 959-964.
- Court-Brown, C. M.; Rimmer, S.; Prakash, U.; McQueen, M. M. (1998): The epidemiology of open long bone fractures. In: *Injury* (29), S. 529-534.
- Court-Brown, C. M.; Ceasar, B. (2006): Epidemiology of adult fractures: A review. In: *Injury* (37), S. 691-697.
- Court-Brown, C. M. (2008): Reamed intramedullary tibial nailing: an overview and analysis of 1106 cases. In: *Journal of orthopaedic trauma* (18), S. 96-101.
- Crowley, D. J.; Kanakaris, N. K.; Giannoudis, P. V. (2007): Irrigation of the wounds in open fractures. In: *The Journal of bone and joint surgery* (89), S. 580-585.
- Davies, J. E. (1998): Mechanisms of endosseous integration. In: *The International journal of prosthodontics* (11), S. 391-401.
- Deckers, M. M.; van, Bezooijen R. L.; van, der Horst G.; Hoogendam, J.; van, Der Bent C.; Papapoulos, S. E.; Lowik, C. W. (2002): Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. In: *Endocrinology* (143), S. 1545-1553.
- DeFranzo, A. J., Argenta, L. C.; Markus, M. W.; Molnar, A. J.; David, L. R.; Webb, L. X.; Ward, W. G.; Teasdall, R. G. (2001): The use of vacuum-assisted closure therapy for the treatment of lower-extremity wounds without exposed bone. In: *Plastic and reconstructive surgery*, (108), S. 1184-1191.
- DeLee, J. C.; Stiehl, J. B. (1981): Open tibia fracture with compartment syndrome. In: *Clinical orthopaedics and related research* (160), S. 175-184.
- den Boer, F. C.; Patka, P.; Bakker, F. C.; Haarman, H. J. Th M. (2002): Current Concepts of Fracture Healing, Delayed Unions, and Nonunions. In: *Osteosynthesis and Trauma Care* (10), S. 1-7.
- Dickson, K.; Katzman, S.; Delgado, E.; Contreras, D. (1994): Delayed unions and nonunions of open tibial fractures. Correlation with arteriography results. In: *Clinical orthopaedics and related research* (302), S. 189-193.
- Dickson, K. F.; Katzman, S.; Paiement, G. (1995): The importance of the blood supply in the healing of tibial fractures. In: *Contemporary orthopaedics* (30), S. 489-493.
- Diefenbeck, M.; Muckley, T.; Hofmann, G. O. (2006): Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. In: *Injury* (37 Supplement 2), S. S95-104.

- Dijke, P. ten; Yamashita, H.; Ichijo, H.; Franzen, P.; Laiho, M.; Miyazono, K.; Heldin, C. H. (1994): Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. In: *Science* (264), S. 101-104.
- Dijke, P. ten; Fu, J.; Schaap, P.; Roelen, B. A. J. (2003): Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. In: *The Journal of bone and joint surgery* (85-A Supplement 3), S. 34-38.
- Dragu, A., Jeffries, J.; Bach, A.D., Horch, R.E. (2008): Prinzipien der Lappenplastiken: Eine Übersicht. In: *Chirurgische Allgemeine Zeitung* (9), S. 59-66.
- Ducy, P.; Karsenty, G. (2000): The family of bone morphogenetic proteins. In: *Kidney international* (57), S. 2207-2214.
- Edwards, C. C. (1983): Staged reconstruction of complex open tibial fractures using Hoffmann external fixation. Clinical decisions and dilemmas. In: *Clinical orthopaedics and related research* (178), S. 130-161.
- Edwards, C. C.; Simmons, S. C.; Browner, B. D.; Weigel, M. C. (1988): Severe open tibial fractures. Results treating 202 injuries with external fixation. In: *Clinical orthopaedics and related research* (230), S. 98-115.
- Einhorn, T. A. (1999): Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. In: *Clinical orthopaedics and related research* (367 Supplement), S. 59-67.
- Ekkernkamp, A.; Muhr, G.; Josten, Ch. (1996): Die infizierte Pseudarthrose. In: *Der Unfallchirurg* (99), S. 914-924.
- Fajardo, M.; Liu, C. J.; Egol, K. (2009): Levels of expression for BMP-7 and several BMP antagonists may play an integral role in a fracture nonunion: a pilot study. In: *Clinical orthopaedics and related research* (467), S. 3071-3078.
- Finkemeier, C. G.; Schmidt, A. H.; Kyle, R. F.; Templeman, D. C.; Varecka, T. F. (2000): A prospective, randomized study of intramedullary nails inserted with and without reaming for the treatment of open and closed fractures of the tibial shaft. In: *Journal of Orthopaedic Trauma* (14), S. 187-193.
- Fischer, M. D.; Gustilo, R. B.; Varecka, T. F. (1991): The timing of flap coverage, bone-grafting, and intramedullary nailing in patients who have a fracture of the tibial shaft with extensive soft-tissue injury. In: *The Journal of bone and joint surgery* (73), S. 1316-1322.
- Fischgrund, J. S.; James, S. B.; Chabot, M. C.; Hankin, R.; Herkowitz, H. N.; Wozney, J. M.; Shirkhoda, A. (1997): Augmentation of autograft using rhBMP-2 and different carrier media in the canine spinal fusion model. In: *Journal of spinal disorders* (10), S. 467-472.

- Flint, L. M.; Richardson, J. D. (1983): Arterial injury with lower extremity fracture. In: Surgery (93), S. 5-8.
- Freedman, E.L.; Johnson, E.E. (1995): Radiographic analysis of tibial fracture malalignment following intramedullary nailing. In: Clinical orthopaedics and related research (315), S. 25-33.
- French, B.; Tornetta, P. (2002): High-energy tibial shaft fractures. In: The orthopaedic clinics of North America (33), S. 211-233.
- Friedlaender, G. E.; Perry, C. R.; Cole, J. D.; Cook, S. D.; Cierny, G.; Muschler, G. F. et al. (2001): Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. In: The Journal of bone and joint surgery (83-A Supplement 1), S. 151-158.
- Friess, W.; Uludag, H.; Foskett, S.; Biron, R.; Sargeant, C. (1999): Characterization of absorbable collagen sponges as rhBMP-2 carriers. In: International Journal of Pharmacology (187), S. 91-99.
- Frost, H. M. (1986): Intermediary organization of the skeleton, Boca Raton, Florida, CRC Press, Jg. 1986.
- Frost, H. M. (1983): The regional acceleratory phenomenon: a review. In: Henry Ford Hospital medical journal (31), S. 3-9.
- Frost, H. M. (1989): The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. In: Clinical orthopaedics and related research (248), S. 294-309.
- Fukushima, N.; Yokoyama, K.; Sasahara, T.; Dobashi, Y.; Itoman, M. (2005): Establishment of rat model of acute staphylococcal osteomyelitis: relationship between inoculation dose and development of osteomyelitis. In: Archives of Orthopaedic Trauma Surgery (125), S. 169-176.
- Gaggero, E.; Canalis, E. (2006): Bone morphogenetic proteins and their antagonists. In: Reviews in endocrine & metabolic disorders (7), S. 51-65.
- Gaggero, E.; Deregowski, V.; Stadmeyer, L.; Gale, N. W.; Economides, A. N.; Canalis, E. (2006): Twisted gastrulation, a bone morphogenetic protein agonist/antagonist, is not required for post-natal skeletal function. In: Bone (39), S. 1252-1260.
- Geesink, R. G.; Hoefnagels, N. H.; Bulstra, S. K. (1999): Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. In: The Journal of bone and joint surgery (81), S. 710-718.
- Geiger, M.; Li, R. H.; Friess, W. (2003): Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. In: Advanced Drug Delivery Review (55), S. 1613-1629.

- Georgiadis, G. M.; Behrens, F. F.; Joyce, M. J.; Earle, A. S.; Simmons, A. L. (1993): Open tibial fractures with severe soft-tissue loss: Limb salvage compared with below-the-knee amputation. In: The Journal of bone and joint surgery (75), S. 1431-1441.
- Ghosh-Choudhury, N.; Harris, M. A.; Feng, J. Q.; Mundy, G. R.; Harris, S. E. (1994): Expression of the BMP 2 gene during bone cell differentiation. In: Critical reviews in eukaryotic gene expression (4), S. 345-355.
- Giannoudis, P. V.; Papakostidis, C.; Roberts, C. (2006a): A review of management of open fractures of the tibia and femur. In: The Journal of bone and joint surgery (88), S. 281-289.
- Giannoudis, P. V.; Tzioupis, C.; Pape, H. C. (2006b): Fat embolism: the reaming controversy. In: Injury (37 Supplement 4), S. S50-58.
- Gillespie, W. J.; Walenkamp, G. H. (2010): Antibiotic prophylaxis for surgery for proximal femoral and other close long bone fractures. In: Cochrane database of systematic reviews (3).
- Glatt, V.; Kwong, F. N.; Park, K.; Parry, N.; Griffin, D.; Vrahas, M. et al. (2009): Ability of recombinant human bone morphogenetic protein 2 to enhance bone healing in the presence of tobramycin: evaluation in a rat segmental defect model. In: Journal of orthopaedic trauma (23), S. 693-701.
- Godina, M. (1986): Early microsurgical reconstruction of complex trauma of the extremities. In: Plastic and reconstructive surgery (78), S. 285-292.
- Gopal, S.; Giannoudis, P. V.; Murray, A.; Mathews, S. J.; Smith, R. M. (2004): The functional outcome of severe, open tibial fractures managed with early fixation and flap coverage. In: The Journal of bone and joint surgery (86), S. 861-867.
- Goumans, M. J.; Mummery, C. (2000): Functional analysis of the TGF-beta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. In: The International journal of developmental biology (44), S. 253-265.
- Govender, S.; Csimma, C.; Genant, H. K.; Valentin-Opran, A. A.; Yehuda; A. R. et al. (2002): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. In: Journal of bone and joint surgery. American Volume (84-A), S. 2123-2134.
- Gregory, P.; Sanders, R. (1995): The management of severe fractures of the lower extremities. In: Clinical orthopaedics and related research (318), S. 95-105.

- Gristina, A. G. (1987): Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. In: *Science* (237), S. 1588-1595.
- Gristina, A. G.; Naylor, P.; Myrvik, Q. (1988-1989): Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. In: *Medical progress through technology*, (14), S. 205-224.
- Gustilo, R. B.; Anderson, J. T. (1976): Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. In: *Journal of bone and joint surgery. American Volume*, (58-A), S. 453-458.
- Gustilo R. B., Mendoza, R. M.; Williams, D. N. (1984): Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *Journal of Trauma* (24), S. 742-746.
- Gustilo, R. B.; Merkow, R. L.; Templeman, D. (1990): The management of open fractures. In: *The Journal of bone and joint surgery* (72), S. 299-304.
- Hansen, M.; Mehler, D.; Voltmer, W.; Rommens, P. M. (2002): The extraarticular proximal tibial fractures. In: *Der Unfallchirurg* (105), S. 858-872.
- Haidar, Z. S.; Hamdy, R. C.; Tabrizian, M. (2009): Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering. In: *Biotechnology letters* (31), S. 1825-1835.
- Hauser, C. J.; Adams, C. A.; Eachampati, S. R. (2006). Surgical Infection Society guideline: prophylactic antibiotic use in open fractures: an evidence-based guideline. In: *Surgical Infections* (7), S. 379-405.
- Hedequist, D., Starr, A. J.; Wilson, P.; Walker, J. (1999): Early versus delayed stabilization of pediatric femur fractures: analysis of 387 patients. In: *Journal of orthopaedic trauma* (13), S.490-493.
- Henley, M. B.; Chapman, J. R.; Agel, J.; Harvey, E. J.; Whorton, A. M.; Swiontkowski, M. F. (1998): Treatment of type II, IIIA, and IIIB open fractures of the tibial shaft: a prospective comparison of unreamed interlocking intramedullary nails and half-pin external fixateurs. In: *Journal of orthopaedic trauma* (12), S. 1-7.
- Henry, S. L.; Ostermann, P. A.; Seligson, D. (1990): The prophylactic use of antibiotic impregnated beads in open fractures. In: *The Journal of trauma* (30), S. 1231-1238.
- Hertel, R.; Strebel, N.; Ganz, R. (1996): amputation versus reconstruction in traumatic defects of the leg: Outcome and costs. In: *Journal of orthopaedic trauma* (10), S. 223-229.

- Hill, P. F.; Clasper, J. C.; Parker, S. J.; Watkins, P. E. (2002): Early intramedullary nailing in an animal model of a heavily contaminated fracture of the tibia. In: *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* (20), S. 648-653.
- Hiraki, Y.; Inoue, H.; Shigeno, C.; Sanma, Y.; Bentz, H.; Rosen, D. M. et al. (1991): Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. In: *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* (6), S. 1373-1385.
- Hiremath, G. K.; Steinmetz, M. P.; Krishnaney, A. A. (2009): Is it safe to use recombinant human bone morphogenetic protein in posterior cervical fusion? In: *Spine* (34), S. 885-889.
- Hofbauer, L. C.; Dunstan, C. R.; Spelsberg, T. C.; Riggs, B. L.; Khosla, S. (1998): Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. In: *Biochemical and biophysical research communications* (250), S. 776-781.
- Hoff, W. S.; Bonadies, J. A.; Cachecho, R.; Dorlac, W. C. (2011): East Practice Management Guidelines Work Group: update to practice management guidelines for prophylactic antibiotic use in open fractures. In: *The Journal of trauma* (70), S. 751-754.
- Hofmann, G. O.; Bar, T.; Buhren, V. (1997): The osteosynthesis implant and early postoperative infection: healing with or without removal of the material?. In: *Der Chirurg* (68), S. 1175-1180.
- Hogan, B. L. (1996): Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. In: *Genes & development* (10), S. 1580-1594.
- Hohmann, E.; Tetsworth, K.; Radziejowski, M. J.; Wiesniewski, T. F. (2007): Comparison of delayed and primary wound closure in the treatment of open tibial fractures. In: *Archives of orthopaedic and trauma surgery* (127), S. 131-136.
- Hollinger, J. O.; Leong, K. (1996): Poly(alpha-hydroxy acids): carriers for bone morphogenetic proteins. In: *Biomaterials* (17), S. 187-194.
- Hollinger, J. O.; Uludag, H.; Winn, S. R. (1998): Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. In: *Advanced drug delivery reviews* (31), S. 303-318.

- Horn, J. Steen, H. Reikeras, O. (2008): Role of the fibula in lower leg fractures: an in vivo investigation in rats. In: *Journal of Orthopaedic Research* (26), S. 1027-1031.
- Horn, J.; Linke, B.; Hontzsch, D.; Gueorguiev, B.; Schwieger, K. (2009): Angle stable interlocking screws improve construct stability of intramedullary nailing of distal tibia fractures: a biomechanical study. In: *Injury* (40), S. 767-771.
- Huddleston, P. M.; Steckelberg, J. M.; Hanssen A. D.; Rousse, M. S.; Bolander, M. E.; Patel, R. (2000): Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. In: *The journal of bone and joint surgery* (82), S. 161-173.
- Hughes, F. J.; Collyer, J.; Stanfield, M.; Goodman, S. A. (1995): The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro. In: *Endocrinology* (136), S. 2671-2677.
- Hulth, A. (1989): Current concepts of fracture healing. In: *Clinical orthopaedics and related research* (249), S. 265-284.
- Hupel, T. M.; Aksenov, S. A.; Schemitsch, E. H. (1998): Effect of limited and standard reaming on cortical bone blood flow and early strength of union following segmental fracture. In: *Journal of orthopaedic trauma* (12), S. 400-406.
- Itoh, K.; Udagawa, N.; Katagiri, T.; Iemura, S.; Ueno, N.; Yasuda, H. et al. (2001): Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. In: *Endocrinology* (142), S. 3656-3662.
- Jaiswal, N.; Haynesworth, S. E.; Caplan, A. I.; Bruder, S. P. (1997): Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. In: *Journal of cellular biochemistry* (64), S. 295-312.
- Janzig, H. M.; Broos, P. L. (2001): Dermotraction: an effective technique for the closure of fasciotomy wounds: a preliminary report of fifteen patients. In: *Journal of orthopaedic trauma* (15), S. 438-441.
- Jena, N.; Martin-Seisdedos, C.; McCue, P.; Croce, C. M. (1997): BMP-7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye. In: *Experimental cell research* (230), S. 28-37.
- Johnson, S. B.; Weaver, F. A.; Yellin, A. E.; Kelly, R.; Bauer, M. (1992): Clinical results of decompressive of dermatomy-fasciotomy. In: *American journal of surgery* (164), S. 286-290.
- Johnsson, R.; Stromqvist, B.; Aspenberg, P. (2002): Randomized radiostereometric study comparing osteogenic protein-1 (BMP-7) and autograft

- bone in human noninstrumented posterolateral lumbar fusion: 2002 Volvo Award in clinical studies. In: *Spine* (27), S. 2654-2661.
- Jones, A. L.; Bucholz, R. W.; Bosse, M. J.; Mirza, S. K.; Lyon, T. R.; Webb, L. X. et al. (2006): Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial. In: *Journal of bone and joint surgery. American Volume* (88), S. 1431-1441.
 - Jones, M. E.; Karlowsky, J. A.; Draghi, D. C.; Thornsberry, C.; Sahm, D. F.; Nathwani, D. (2004): Antibiotic susceptibility of bacteria most commonly isolated from bone related infections: the role of cephalosporins in antimicrobial therapy. In: *International journal of antimicrobial agents* (23), S. 240-246.
 - Kai, H.; Yokoyama, K.; Shindo, M.; Itoman, M. (1998): Problems of various fixation methods for open tibia fractures: experience in a Japanese level I trauma center. In: *American Journal of orthopaedics* (27), S. 631-636.
 - Kalbitz, M.; Baum, H. (2009): Frühe postoperative Wundinfektionen in Orthopädie und Unfallchirurgie. In: *Krankenhaushygiene up2date* (4), S. 321-334.
 - Kanakaris, N. K.; Paliobeis, C.; Nlanidakis, N.; Giannoudis, P. V. (2007): Biological enhancement of tibial diaphyseal aseptic non-unions: the efficacy of autologous bone grafting, BMPs and reaming by-products. In: *Injury* (38 Supplement 2), S. S65-75.
 - Kandziora, F.; Bail, H.; Schmidmaier, G.; Schollmeier, G.; Scholz, M.; Knispel, C.; Hiller, T.; Pflugmacher, R.; Mittlmeier, T.; Raschke, M.; Haas, N. P. (2002): Bone morphogenetic protein-2 application by a poly(D,L-lactide)-coated interbody cage: in vivo results of a new carrier for growth factors. In: *Journal of neurosurgery* (97 Supplement 1), S. 40-48.
 - Kaplan, F. S.; Tabas, J. A.; Zasloff, M. A. (1990): Fibrodysplasia ossificans progressiva: a clue from the fly? In: *Calcified tissue international* (47), S. 117-125.
 - Katagiri, T.; Yamaguchi, A.; Ikeda, T.; Yoshiki, S.; Wozney, J. M.; Rosen, V. et al. (1990): The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. In: *Biochemical and biophysical research communications* (172), S. 295-299.
 - Katagiri, T.; Yamaguchi, A.; Komaki, M.; Abe, E.; Takahashi, N.; Ikeda, T. et al. (1994): Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. In: *The Journal of cell biology* (127) S. 1755-1766.

- Kawabata, M.; Imamura, T.; Miyazono, K. (1998): Signal transduction by bone morphogenetic proteins. In: Cytokine & growth factor reviews (9), S. 49-61.
- Keating, J. F.; O'Brien, P. J.; Blachut, P. A.; Meek, R. N.; Broekhuysse, H. M. (1997): Locking intramedullary nailing with and without reaming for open fractures of the tibial shaft. A prospective, randomized study. In: Journal of bone and joint surgery. American Volume (79), S. 334-341.
- Keating, J. F.; Blachut, P. A.; O'Brien, P. J.; Court-Brown, C. M. (2000): Reamed nailing of Gustilo grade-IIIB tibial fractures. In: Journal of bone and joint surgery. British Volume (82), S. 1113-1116.
- Kingsley, D. M. (1994): The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. In: Genes & development (8), S. 133-146.
- Klein, M.P.; Rahn, B.A.; Frigg, A.; Kessler, R.; Perren, S.M. (1990): Reaming versus non-reaming in medullary nailing: Interference with cortical circulation of the canine tibia. Archives of orthopaedic and trauma surgery (109), S. 314-316.
- Klemm, K. W.; Borner, M. (1986): Interlocking nailing of complex fractures of the femur and tibia. In: Clinical orthopaedics and related research (212), S. 89-100.
- Kloen, P.; Doty, S. B.; Gordon, E.; Rubel, I. F.; Goumans, M. J.; Helfet, D. L. (2002): Expression and activation of the BMP-signaling components in human fracture nonunions. In: Journal of bone and joint surgery. American Volume (84-A), S. 1909-1918.
- Krettek, C. (2001): Prinzipien der intramedullären Knochenbruchstabilisierung. Teil 1. In: Der Unfallchirurg (104), S. 639-652.
- Krötz, M.; Linsenmaier, U.; Reiser, M. (2004): Diagnostik der Osteitis. In: Schnettler R., Steinau U. (Hrsg.). Septische Knochenchirurgie. Thieme, Stuttgart, Berlin, New York, S. 16-71.
- Kuboki, Y.; Takita, H.; Kobayashi, D.; Tsuruga, E.; Inoue, M.; Murata, M. et al. (1998): BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. In: Journal of biomedical materials research (39), S. 190-199.
- Kwong, F. N.; Harris, M. B. (2008): Recent developments in the biology of fracture repair. In: The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons (16), S. 619-625.
- Kwong, F. N.; Hoyland, J. A.; Freemont, A. J.; Evans, C. H. (2009): Altered relative expression of BMPs and BMP inhibitors in cartilaginous areas of human

- fractures progressing towards nonunion. In: Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society (27), S. 752-757.
- Labler, L.; Keel, M., Trentz, O. (2004): Vacuum-assisted closure (V.A.C.) for temporary coverage of soft-tissue injury in type III open fracture of the lower extremities. In: European journal of trauma (30), S. 305-312.
 - Langenfeld, E. M.; Langenfeld, J. (2004): Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. In: Molecular cancer research (2), S. 141-149.
 - Larsson, K.; von der Linden, W. (1983): Open tibial shaft fractures. In: Clinical orthopaedics and related research (180), S. 63-67.
 - Lee, J. (1997). Efficacy of cultures in the management of open fractures. In: Clinical orthopaedics and related research (339), S. 71-75.
 - Lee, J. H.; Kim, C. S.; Choi, K. H.; Jung, U. W.; Yun, J. H.; Choi, S. H.; Cho, K. S. (2010): The induction of bone formation in rat calvarial defects and subcutaneous tissues by recombinant human BMP-2, produced in Escherichia coli. In: Biomaterials (31), S. 3512-3519.
 - Lehnhardt, M.; Homann, H. H.; Steinau, H. U. (2004): Plastisch rekonstruktive Eingriffe. In: Schnettler R., Steinau U. (Hrsg.). Septische Knochenchirurgie. Thieme, Stuttgart, Berlin, New York, S. 165-222.
 - Li, D.; Gromov, K.; Soballe, K.; Puzas, J. E.; O'Keefe, R. J.; Awad, H. et al. (2008): Quantitative mouse model of implant-associated osteomyelitis and the kinetics of microbial growth, osteolysis, and humoral immunity. In: Journal of Orthopaedic Research (26), S. 96-105.
 - Li, R. H.; Wozney, J. M. (2001): Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. In: Trends in biotechnology (19), S. 255-265.
 - Lieberman, J. R.; Daluiski, A.; Einhorn, T. A. (2002): The Role of Growth Factors in the Repair of Bone. Biology and Clinical Applications. In: Journal of bone and joint surgery. American Volume (84), S. 1032-1044.
 - Liu, F.; Ventura, F.; Doody, J.; Massague, J. (1995): Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. In: Molecular and cellular biology (15), S. 3479-3486.
 - Lorenz, J. (2009): Treatment of severe sepsis. In: Pneumologie (63), S. 197-204.
 - Luchette, F. A.; Bone, L. B.; Born, C. T.; DeLong, W. G.; Hoff, W. S.; Mullins, D.; Palumbo, F.; Pasquale, M. D. (1998): EAST Practice management working group: practice management guidelines for prophylactic antibiotic use in open fractures. In: The Journal of Trauma (70), S. 751-754.

- Lucke, M.; Schmidmaier, G.; Sadoni, S.; Wildemann, B.; Schiller, R.; Stemberger, A.; Haas, N. P.; Raschke, M. (2003a): A new model of implant-related osteomyelitis in rats. In: *Journal Biomedical Material Research. Part B, Applied biomaterials* (67), S. 593-602.
- Lucke, M.; Schmidmaier, G.; Sadoni, S.; Wildemann, B.; Schiller, R.; Haas, N. P.; Raschke, M. (2003b): Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. In: *Bone* (32), S. 521-531.
- Lucke, M.; Wildemann, B.; Sadoni, S.; Surke, C.; Schiller, R.; Stemberger, A. et al. (2005): Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. In: *Bone* (36), S. 770-778.
- Maheshwari, R.; Taitzman, L. A.; Barei, D. P. (2008): Single-incision fasciotomy for compartmental syndrome of the leg in patients with diaphyseal tibia fractures. In: *Journal of orthopaedic trauma* (22), S. 722-730.
- Marsh, D. (1998): Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. In: *Clinical orthopaedics and related research* (355 Supplement), S. S22-30.
- Mashru, R. P.; Hermann, M. J.; Pizzutillo, P. D. (2005): Tibial shaft fractures in children and adolescents. In: *The Journal of the American Academy of Orthopaedic surgeons* (13), S. 345-352.
- Masquelet, A. C.; Fitoussi, F.; Begue, T.; Muller, G. P (2000): Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. In: *Annales de chirurgie plastique et esthetique* (45), S. 346-353.
- Martin, G. J., Boden, S. D.; Marone, M. A.; Marone, M. A.; Moskovitz, P. A. (1999): Posterolateral intertransverse process spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a nonhuman primate: important lessons learned regarding dose, carrier, and safety. In: *Journal of spinal disorders* (12), S. 179-186.
- Maruoka, Y.; Oida, S.; Iimura, T.; Takeda, K.; Asahina, I.; Enomoto, S.; Sasaki, S. (1995): Production of functional human bone morphogenetic protein-2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system. In: *Biochemistry and molecular biology international* (35), S. 957-963.
- Marx, R. E.; Garg, A. K. (1998): Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. In: *Implant dentistry* (7), S. 267-276.
- Massague, J. (1998): TGF-beta signal transduction. In: *Annual review of biochemistry* (67), S. 753-791.
- McKay, B. Sandhu, H. S. (2002): Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spinal fusion applications. In: *Spine* (27 Supplement 1), S. 66-85.

- McKibbin, B. (1978): The biology of fracture healing in long bones. In: The Journal of bone and joint surgery (60-B), S. 150-162.
- McPherson, J.C.3rd; Runner, R. R.; Shapiro, B.; Walsh, D. S.; Stephens-DeValle, J.; Buxton, T. B. (2008): An acute osteomyelitis model in traumatized rat tibiae involving sand as a foreign body, thermal injury, and biomicrobial contamination. In: Comparative medicine (58), S. 369-374.
- Melvin, J. S; Dombroski, D. G.; Torbert, J. T.; Kovach, S. J.; Esterhai, J. L.; Mehta, S. (2010a): Open tibial shaft fractures: I. Evaluation and initial wound management. In: The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, (18), S. 10-19.
- Melvin, J. S; Dombroski, D. G.; Torbert, J. T.; Kovach, S. J.; Esterhai, J. L.; Mehta, S. (2010b): Open tibial shaft fractures: II. Definitive management and limb salvage. In: The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons (18), S. 108-117.
- Miyazawa, K.; Kawai, T.; Urist, M. R. (1996): Bone morphogenetic protein-induced heterotopic bone in osteopetrosis. In: Clinical orthopaedics and related research (324), S. 259-268.
- Monzon, M.; Garcia-Alvarez, F.; Lacleriga, A.; Gracia, E.; Leiva, J.; Oteiza, C.; Amorena, B. (2001): A simple infection model using pre-colonized implants to reproduce rat chronic Staphylococcus aureus osteomyelitis and study antibiotic treatment. In: Journal of Orthopaedic Research (19), S. 820-826.
- Moutsatsos, I. K.; Turgeman, G.; Zhou, S.; Kurkalli, B. G.; Pelled, G.; Tzur, L. et al. (2001): Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. In: Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy (3), S. 449-461.
- Mouzopoulos, G.; Kanakaris, N. K.; Kontakis, G.; Obakponovwe, O.; Townsend, R.; Giannoudis, P. V. (2011): Management of bone infections in adults: the surgeon's and microbiologist's perspectives. In: Injury (42 Supplement 5), S. 18-23.
- Nakase, T.; Nomura, S.; Yoshikawa, H.; Hashimoto, J.; Hirota, S.; Kitamura, Y. et al. (1994): Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. In: Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research (9), S. 651-659.
- Niedhart, C.; Pingsmann, A.; Jürgens, C.; Marr, A.; Blatt, R.; Niethard, F. U. (2003): Komplikationen nach Entnahme autologen Knochens aus dem ventralen und dorsalen Beckenkamm - eine prospektive, kontrollierte Studie.

Donor Site Morbidity after Bone Graft Harvesting from the Ventral and Dorsal Iliac Crest - a Prospective, Controlled Study. In: Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete (141), S. 481-486.

- Niikura, T.; Hak, D. J.; Reddi, A. H. (2006): Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures. In: Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society (24), S. 1463-1471.
- Olson, S. A.; Schemitsch, E. H. (2003): Open fractures of the tibial shaft: an update. In: Instructional course lectures (52), S. 623-631.
- Olson, S. A.; Glasgow, R. R. (2005): Acute compartment syndrome in lower extremity musculoskeletal trauma. In: The Journal of the American Academy of Orthopaedic surgeons (13), S. 436-444.
- Onishi, T.; Ishidou, Y.; Nagamine, T.; Yone, K.; Imamura, T.; Kato, M. et al. (1998): Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. In: Bone (22), S. 605-612.
- O'Shaughnessy, B. A.; Kuklo, T. R.; Ondra, S. L. (2008): Surgical treatment of vertebral osteomyelitis with recombinant human bone morphogenetic protein-2. In: Spine (33), S. 132-139.
- Osterman, A. L.; Bora, F. W. (1984): Free vascularized bone grafting for large-gap nonunion of long bones. In: The Orthopedic clinics of North America (15), S. 131-142.
- Papakostidis, C.; Kanakaris, N. K.; Pretel, J.; Faour, O.; Morell, D. J.; Giannoudis, P.V. (2011): Prevalence of complications of open tibial shaft fractures stratified as per the Gustilo-Anderson classification. In: Injury (41), S. 1408-1415.
- Pape, H. C.; Dwenger, A.; Regel, G.; Schweitzer, G.; Jonas, M.; Remmers, D. et al. (1992): Pulmonary damage after intramedullary femoral nailing in traumatized sheep--is there an effect from different nailing methods? In: The Journal of trauma (33) S. 574-581.
- Pape, H. C.; Krettek, C.; Maschek, H.; Regel, G.; Tscherne, H. (1996): Fatal pulmonary embolization after reaming of the femoral medullary cavity in sclerosing osteomyelitis: a case report. In: Journal of orthopaedic trauma (10), S. 429-432.
- Patzakis, M. J.; Wilkins, J.; Wiss, D. A. (1986): Infection following intramedullary nailing of long bones. Diagnosis and management. In: Clinical orthopaedics and related research (212), S. 182-191.

- Patzakis, M. J.; Wilkins, J. (1989): Factors influencing infection rate in open fracture wounds. In: Clinical orthopaedics and related research (243), S. 36-40.
- Patzakis, M. J.; Bains, R. S.; Lee, J.; Singer, G.; Ressler, R.; Harvey, F.; Holtom, P. (2000): Prospective, randomized, double-blind study comparing single-agent antibiotic therapy, ciprofloxacin, to combination antibiotic therapy in open fracture wounds. In: Journal of orthopaedic trauma (14), S. 529-533.
- Patzakis, M. J.; Zalavras, C. G. (2005): Chronic posttraumatic osteomyelitis and infected nonunion of the tibia: current management concepts. In: The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons (13), S. 417-427.
- Pelissier, P.; Masquelet, A. C.; Bareille, R.; Pelissier, S. M.; Amedee, J. (2004): Induced membrane secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. In: Journal of orthopaedic research (22), S. 73-79.
- Poelstra, K. A.; Barekzi, N. A.; Rediske, A. M.; Felts, A. G.; Slunt, J. B.; Grainger, D. W. (2002): Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies. In: Journal of biomedical materials research (60), S. 206-215.
- Pollack, A. N.; McCarthy M. L.; Burgess, A. R. (2000): Short-term wound complications after application of flaps for coverage of traumatic soft-tissue defects about the tibia: The Lower Extremity Assessment Project (LEAP) Study Group. In: The Journal of bone and joint surgery (82), S. 1681-1691.
- Potier, E.; Ferreira, E.; Andriamanalijaona, R.; Pujol, J. P.; Oudina, K.; Logeart-Avramoglou, D.; Petite, H. (2007): Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. In: Bone (40), S. 1078-1087.
- Poultsides, L. A.; Papatheodorou, L. K.; Karachalios, T. S.; Khaldi, L.; Maniatis, A.; Petinaki, E.; Malizos, K. N. (2008): Novel model for studying hematogenous infection in an experimental setting of implant-related infection by a community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* strain. In: J Orthop Res (26), S. 1355-1362.
- Ramoshebi, L. N.; Ripamonti, U. (2000): Osteogenic protein-1, a bone morphogenetic protein, induces angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane and synergizes with basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta1. In: The Anatomical record (259), S. 97-107.
- Rao, N.; Ziran, B. H.; Lipsky, B. A. (2011): Treatment osteomyelitis: antibiotics and surgery. In: Plastic and reconstructive surgery (127 Supplement 1), S. 177-187.

- Rao, V. V.; Loffler, C.; Wozney, J. M.; Hansmann, I. (1992): The gene for bone morphogenetic protein 2A (BMP2A) is localized to human chromosome 20p12 by radioactive and nonradioactive in situ hybridization. In: Human genetics (90), S. 299-302.
- Reddi, A. H. (1981): Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. In: Collagen and related research (1), S. 209-226.
- Reddi, A. H. (1998): Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. In: Nature biotechnology (16), S. 247-252.
- Reott, M. A.; Ritchie-Miller, S. L.; Anguita, J.; Hudson, M. C. (2008): TRAIL expression is induced in both osteoblasts containing intracellular Staphylococcus aureus and uninfected osteoblasts in infected cultures. In: FEMS microbiology letters (278), S. 185-192.
- Reverte, M. M.; Dimitriou, R.; Kanakaris, N. K.; Giannoudis, P. V. (2011): What is the effect of compartment syndrome and fasciotomies on fracture healing in tibial fractures? In: Injury (42), S. 1402-1407.
- Ripamonti, U.; van Den Heever, B.; Sampath, T. K.; Tucker, M. M.; Rueger, D. C.; Reddi, A. H. (1996): Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1, bone morphogenetic protein-7). In: Growth factors (13), S. 273-89.
- Ristaniemi, J.; Lakovaara, M.; Flinckkilä, T.; Jalovaara, P. (2007): Staged method using antibiotic beads and subsequent autografting for large traumatic tibial bone loss: 22 of 23 fractures healed after 5-20 months. In: Acta orthopaedica (78), S. 520-527.
- Rixen, D.; Sauerland, S.; Östern, H.-J.; Bouillon, B. (2005): Versorgungsstrategien in der ersten postoperativen Phase nach Verletzung langer Röhrenknochen der unteren Extremität beim Polytrauma. In: Der Unfallchirurg (108), S. 829-842.
- Ronga, M.; Baldo, F.; Zappala, G.; Cherubino, P. (2006): Recombinant human bone morphogenetic protein-7 for treatment of long bone non-union: an observational, retrospective, non-randomized study of 105 patients. In: Injury (37 Supplement 3), S. S51-6.
- Rueger, J. M. (1996): Bone substitutes. State of the art and: what lies ahead? In: Der Unfallchirurg (99), S. 228-236.
- Ruppert, R.; Hoffmann, E.; Sebald, W. (1996): Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. In: European journal of biochemistry / FEBS (237), S. 295-302.
- Rüter, A.; Mayr, E. (1999): Pseudarthrosen. In: Der Chirurg (70), S. 1239-1245.

- Saddawi-Konefka, D., Kim, H. M.; Chung, K. C. (2008): A systematic review of outcomes and complications of reconstruction and amputation for type IIIB and IIIC fractures of the tibia. In: Plastic and reconstructive surgery (122), S. 1796-1805.
- Salgado, C. J.; Jamali, A. A.; Mardini, S.; Buchanan, K.; Veit, B. (2005): A model for chronic osteomyelitis using *Staphylococcus aureus* in goats. In: Clinical Orthopaedics and Related Research (436), S. 246-250.
- Sampath, T. K.; Maliakal, J. C.; Hauschka, P. V.; Jones, W. K.; Sasak, H.; Tucker, R. F. et al. (1992): Recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. In: The Journal of biological chemistry (267), S. 20352-20362.
- Sandberg, M. M. (1991): Matrix in cartilage and bone development: current views on the function and regulation of major organic components. In: Annals of medicine, (23), S. 207-217.
- Sanders, R.; Swiontkowski, M. F.; Nunley, J. A., Spiegel, P. G. (1994): The management of fractures with soft-tissue disruptions. In: Instructional course lectures, (43), S. 559-570.
- Sandhu, H. S.; Kanim, L. E.; Kabo, J. M.; Toth, J. M.; Zeegan, E. N.; Liu, D. (1995): Evaluation of rhBMP-2 with an OPLA carrier in a canine posterolateral (transverse process) spinal fusion model. In: Spine (20), S. 2669-2682.
- Schandelmaier, P.; Krettek, C.; Rudolf, J.; Tscherne, H. (1995): Outcome of tibial shaft fractures with severe soft tissue injury treated by unreamed nailing versus external fixation (39), S. 707-711.
- Schandelmaier, P.; Krettek, C.; Rudolf, J.; Kohl, A.; Katz, B.E.; Tscherne, H. (1997): Superior results of tibial roding versus external fixation in grade 3B fractures. In: Clinical orthopaedics and related research (342), S. 164-172.
- Scheithauer, S.; Häfner, H.; Lemmen S. W. (2012): Das Keimspektrum von heute – gegen wen kämpfen wir. In: Der Orthopäde (41), S. 6-10.
- Schemitsch, E. H.; Kowalski, M. J.; Swiontkowski, M. F.; Senft, D. (1994): Cortical bone blood flow in reamed and unreamed locked intramedullary nailing: A fractured tibia model in sheep. In: Journal of orthopaedic trauma, (8), S. 373-382.
- Schemitsch, E. H.; Kowalski, M. J.; Swiontkowski, M. F.; Harrington, R. M. (1995): Comparison of the effect of reamed and undreamed locked

- intramedullary nailing on blood flow in the callus and strength of union following fracture of the sheep tibia. In: *Journal of orthopaedic research* (13), S. 382-389.
- Schenk, R. K.; Buser, D. (1998): Osteointegration: a reality. In: *Periodontology* 2000 (17), S. 22-35.
 - Schmidmaier, G.; Wildemann, B.; Cromme, F.; Kandziora, F.; Haas, N. P.; Raschke, M. (2002): Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. In: *Bone* (30), S. 816-822.
 - Schmidmaier, G.; Lucke, M.; Wildemann, B.; Haas, N. P.; Raschke, M. (2006): Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. In: *Injury* (37 Supplement 2), S105-112.
 - Schmidmaier, G.; Schwabe, P.; Strobel, C.; Wildemann, B. (2008): Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics. In: *Injury* (39 Supplement 2), S. S37-43.
 - Schnettler, R.; Alt, V. (2004): Pathophysiologie und Klassifikation der Osteitis. In: Schnettler R., Steinau U. (Hrsg.). *Septische Knochenchirurgie*. Thieme, Stuttgart, Berlin, New York, S. 5-15.
 - Schweiberer, L.; Baumgart, R.; Deiler, S. (1999): [The biological reaction in atrophic and hypertrophic pseudarthrosis of diaphysis of long bone. Causes and forms of appearance]. In: *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* (70), S. 1193-1201.
 - Sears, E.D.; Davis, M.M.; Chung, K.C. (2012): Relationship between timing of emergency procedures and limb amputation in patients with open tibia fracture: United States, 2003-2009. In: *Plastic and reconstructive surgery*, Epub ahead of print.
 - Seeherman, H.; Wozney, J. M. (2005): Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. In: *Cytokine Growth Factor Review* (16), S. 329-345.
 - Sekiya, I.; Larson, B. L.; Smith, J. R.; Pochampally, R.; Cui, J.-G.; Prockop, D. J. (2002): Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. In: *Stem cells* (20), S. 530-541.
 - Siebenrock, K. A.; Schilling, B.; Jacob, R. P. (1993): Treatment of complex tibial shaft fractures. Arguments for early secondary intramedullary nailing. In: *Clinical orthopaedics and related research* (290), S. 269-274.

- Siggelkow, H.; Hufner, M. (1999): Modulation of osteoblastogenesis: implications for pathophysiology of osteoporosis. In: Deutsche medizinische Wochenschrift (124), S. 1-2.
- Sluzalek, M.; Gazdzik, T. S.; Mrozek, S.; Ryba, J. (2004): External fixation in the treatment of severe tibial fractures complicated by soft tissue injury. In: Ortopedia, traumatologia, rehabilitacja (6), S. 103-112.
- Smith, A. W. (2005): Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? In: Advanced drug delivery reviews (57), S. 1539–1550.
- Soni, A.; Tzafetta, K.; Knight, S; Giannoudis, P. V. (2012): Gustilo IIIc fractures in the lower limb: Our 15-year experience. In: The Journal of bone and joint surgery (94), S. 698-703.
- Southwood, L. L.; Frisbie, D. D.; Kawcak, C. E.; Ghivizzani, S. C.; Evans, C. H.; McIlwraith, C. W. (2004): Evaluation of Ad-BMP-2 for enhancing fracture healing in an infected defect fracture rabbit model. In: Journal of Orthopaedic Research (22), S. 66-72.
- Spellberg, B., Lipsky, B. A. (2012): Systemic antibiotic therapy for chronic osteomyelitis in adults. In: Clinical infectious diseases (54), S. 393-407.
- Speziale, P.; Raucci, G.; Visai, L.; Switalski, L.M.; Timpl, R.; Hook, M. (1986): Binding of collagen to Staphylococcus aureus Cowan 1. In: Journal of bacteriology (167), S. 77-81.
- Steffen, T.; Stoll, T.; Arvinte, T.; Schenk, R. K. (2001): Porous tricalcium phosphate and transforming growth factor used for anterior spine surgery. In: European spine journal: official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society (10 Supplement 2), S.132-140.
- Stokel, E. A.; Sadasivan, K. K. (1991): Tibial plateau fractures: standardized evaluation of operative results. In: Orthopedics (14), S. 263-270.
- Street, J.; Bao, M.; deGuzman, L.; Bunting, S.; Peale, F. V., JR; Ferrara, N. et al. (2002): Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (99), S. 9656-9661.
- Sturmer, K. M.; Schuchardt, W. (1980): New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. II. Intramedullary pressure in marrow cavity reaming. In: Unfallheilkunde (83), S. 346-352.
- Swiontkowski, M. F.; Aro, H. T.; Donell, S.; Esterhai, J. L.; Goulet, J.; Jones, A. et al. (2006): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial

fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. In: *Journal of Bone and Joint Surgery. American volume* (88), S. 1258-1265.

- Tabas, J. A.; Zasloff, M.; Wasmuth, J. J.; Emanuel, B. S.; Altherr, M. R.; McPherson, J. D. et al. (1991): Bone morphogenetic protein: chromosomal localization of human genes for BMP1, BMP2A, and BMP3. In: *Genomics* (9) S. 283-289.
- Takuwa, Y.; Ohse, C.; Wang, E. A.; Wozney, J. M.; Yamashita, K. (1991): Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. In: *Biochemical and biophysical research communications* (174), S. 96-101.
- Termaat, M. F.; Den, Boer F. C.; Bakker, F. C.; Patka, P.; Haarman, H. J. (2005): Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. In: *The Journal of bone and joint surgery* (87), S. 1367-1378.
- Thies, R. S.; Bauduy, M.; Ashton, B. A.; Kurtzberg, L.; Wozney, J. M.; Rosen, V. (1992): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. In: *Endocrinology* (130), S. 1318-1324.
- Tice, A. D. (1991): Ceftriaxone in treatment of serious infections. Osteomyelitis. In: *Hospital practice Office ed.* (26 Supplement 5), S. 31-36.
- Tiainen, L.; Lindahl, J. E.; Tukiainen, E. J. (2007). Acute unreamed intramedullary nailing and soft tissue reconstruction with muscle flaps for the treatment of severe open tibial shaft fractures. In: *Injury* (38), S. 906-912.
- Tillett, W. S.; Francis, T. (1930): Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. In: *The Journal of Experimental Medicine* (52), S. 561-571.
- Tornetta, P. 3rd.; Bergmann, M.; Watnik, N.; Berkowitz, G.; Steuer, J. (1994): Treatment of grade-IIIb open tibial fractures. A prospective randomised comparison of external fixation and non-reamed locked nailing. *Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* (76), S. 13-19.
- Toriumi, D. M.; Kotler, H. S.; Luxenberg, D. P.; Holtrop, M. E.; Wang, E. A. (1991): Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histological, and biomechanical evaluation. In: *Archives of otolaryngology-head & neck surgery* (117), S. 1101-1112.
- Trampuz, A.; Zimmerli, W. (2005): Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. In: *Swiss medical weekly: official journal of the Swiss*

Society of Infectious Diseases, the Swiss Society of Internal Medicine, the Swiss Society of Pneumology (135), S. 243-251.

- Trampuz, A.; Zimmerli, W. (2006): Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. In: *Injury* (37 Supplement 2), S. S59-66.
- Tscherne, H. (1984): The management of open fractures. In: Tscherne, H.; Gotzen, L. (Hrsg.). *Fractures with soft tissue injuries*. Springer, Berlin. S. 10-32.
- Tu, Y. K.; Lin, C. H.; Su, J. I.; Hsu, D. T.; Chen, R. J. (1995): Unreamed intramedullary nail versus external fixator for type III tibial fractures. In: *The Journal of trauma* (39), S. 361-367.
- Ueno, M.; Yokohama, K.; Nakamura, K.; Uchino, M.; Suzuki, T.; Itoman, M. (2006): Early unreamed intramedullary nailing without a safety interval and simultaneous flap coverage following external fixation in type IIIB open tibial fractures: A report of four successful cases. In: *Injury* (37), S. 289-294.
- Uludag, H.; Gao, T.; Porter, T. J.; Friess, W.; Wozney, J. M. (2001): Delivery systems for BMPs: factors contributing to protein retention at an application site. In: *Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* (83 Supplement 1), S. 128-35.
- Urist, M. R. (1965): Bone: formation by autoinduction. In: *Science* (150), S. 893-899.
- Urist, M. R.; Mikulski, A.; Lietze, A. (1979): Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (76), S. 1828-1832.
- Vacheethasane, K.; Marchant R. E. (2000): in *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*, ed. Y. H. An and R. J. Friedman, Humana Press, Totowa, S.73-90.
- Valentin-Opran, A.; Wozney, J.; Csimma, C.; Lilly, L.; Riedel, G. E. (2002): Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* (395), S. 110-120.
- Valenziano, C. P.; Chattar-Cora, D.; O'Neill, A.; Hubli, E. H.; Cudjoe, E. A. (2002): Efficacy of primary wound cultures in long bone open extremity fractures: are they of any value? In: *Archives of orthopaedic and trauma surgery* (122), S. 259-261.
- Vallejo, L. F.; Brokelmann, M.; Marten, S.; Trappe, S.; Cabrera-Crespo, J.; Hoffmann, A. et al. (2002): Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. In: *Journal of biotechnology*, (94), S. 185-194.

- Vallejo, L. F.; Rinas, U. (2004): Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration. In: *Biotechnology and bioengineering*, (85), S. 601-609.
- Vogelin, E.; Jones, N. F.; Huang, J. I.; Brekke, J. H.; Lieberman, J. R. (2005): Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. In: *The Journal of bone and joint surgery* (87), S. 1323-1331.
- Wan, D. C.; Pomerantz, J. H.; Brunet, L. J.; Kim, J. B.; Chou, Y. F.; Wu, B. M. et al. (2007): Noggin suppression enhances in vitro osteogenesis and accelerates in vivo bone formation. In: *The Journal of biological chemistry* (282), S. 26450-26459.
- Wang, E. A.; Israel, D. I.; Kelly, S.; Luxenberg, D. P. (1993): Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. In: *Growth factors* (9), S. 57-71.
- Wang, E. A.; Rosen, V.; Cordes, P.; Hewick, R. M.; Kriz, M. J.; Luxenberg, D. P. et al. (1988): Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (85), S. 9484-9488.
- Wang, E. A.; Rosen, V.; D'Alessandro, J. S.; Bauduy, M.; Cordes, P.; Harada, T. et al. (1990): Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (87), S. 2220-2224.
- Weiland, A.J.; Moore, J.R.; Daniel, R.K. (1983): Vascularized bone autografts. Experience with 41 cases. In: *Clinical orthopaedics and related research* (174), S. 87-95.
- Wenda, K.; Ritter, G.; Degreif, J.; Rudigier, J. (1988): Pathogenesis of pulmonary complications following intramedullary nailing osteosyntheses. In: *Der Unfallchirurg* (91), S. 432-435.
- White, T. O.; Howell, G. ED.; Will, E. M.; Court-Brown, C. M.; McQueen, M. M. (2003): Elevated intramuscular compartment pressures do not influence outcome after tibial fracture. In: *The Journal of trauma* (55), S. 1133-1138.
- Worlock, P.; Slack, R.; Harvey, L.; Mawhinney, R. (1994): The prevention of infection in open fractures: an experimental study of the effect of fracture stability. In: *Injury* (25), S. 31-38.
- Wozney, J. M.; Rosen, V.; Celeste, A. J.; Mitsock, L. M.; Whitters, M. J.; Kriz, R. W. et al. (1988): Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. In: *Science* (242), S. 1528-1534.

- Wozney, J. M. (2002): Overview of bone morphogenetic proteins. In: Spine (27 Supplement 1), S. 2-8.
- Xu, K. D.; McFeters, G. A.; Stewart, P. S. (2000): Biofilm resistance to antimicrobial agents. In: Microbiology (146), S. 547-549.
- Yamaguchi, A.; Katagiri, T.; Ikeda, T.; Wozney, J. M.; Rosen, V.; Wang, E. A. et al. (1991): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. In: The Journal of cell biology (113), S. 681-687.
- Yasko, A. W.; Lane, J. M.; Fellingner, E. J.; Rosen, V.; Wozney, J. M.; Wang, E. A. (1992): The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. In: Journal of Bone and Joint Surgery. American volume (74), S. 659-670.
- Yazar, S.; Lin, C. H.; Lin, Y. T.; Ulusal, A. E.; Wie, F. C. (2006): Outcome comparison between free muscle and free fasciocutaneous flaps for reconstruction of distal third and ankle traumatic open tibial fractures. In: Plastic and reconstructive surgery (117), S. 2468-2477.
- Young, M. J.; Barrack, R. L. (1994): Complications of internal fixation of tibial plateau fractures. In: Orthopaedic review (23), S. 149-154.
- Zannis, J.; Angobaldo, J.; Marks, M.; DeFranzo, A.; David, L.; Molnar, J.; Argenta, L. (2009): Comparison of fasciotomy wound closures using traditional dressing changes and the vacuum assisted closure device. In: Annals of plastic surgery (62), S. 436-444.
- Zapf, J.; Hauri, C.; Waldvogel, M.; Froesch, E. R. (1986): Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulin-like growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. In: The Journal of clinical investigation (77), S. 1768-1775.
- Zegzula, H. D.; Buck, D. C.; Brekke, J.; Wozney, J. M.; Hollinger, J. O. (1997): Bone formation with use of rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2). In: Journal of Bone and Joint Surgery. American volume (79), S. 1778-1790.
- Zhang, H.; Bradley, A. (1996): Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. In: Development (122), S. 2977-2986.
- Zheng, M. H.; Wood, D. J.; Wysocki, S.; Papadimitriou, J. M.; Wang, E. A. (1994): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances expression of interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 genes in

normal human osteoblast-like cells. In: Journal of cellular physiology (159), S. 76-82.

- Zioncheck, T. F.; Chen, S. A.; Richardson, L.; Mora-Worms, M.; Lucas, C.; Lewis, D. et al. (1994): Pharmacokinetics and tissue distribution of recombinant human transforming growth factor beta 1 after topical and intravenous administration in male rats. In: Pharmaceutical research (11), S. 213-220.
- Ziran, B.H. (2007): Osteomyelitis. In: The Journal of Trauma (62 Supplement), S. 59-60.

11 Publikationsverzeichnis

Alt, V.; Lips, K.S.; Henkenberens, C.; Muhrer, D.; Cavalcanti-Garcia, M.; Sommer, U.; Thormann, U.; Szalay, G.; Heiss, C.; Pavlidis, T.; Domann, E.; Schnettler, R. (2011): A new animal for implant-related infected non-unions after intramedullary fixation of the tibia in rats with fluorescent *in situ* hybridization of bacteria in bone infection. In: Bone (48), S. 1146-1153.

12 Vortrag

Henkenberens, C., Muhrer, D., Domann, E., Schnettler, R., Alt, V.: Der Effekt von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) bei bakteriell kontaminierten Frakturen am Tibiaschaft von Ratten. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin 2009

13 Preise

Gewinner des Robert Mathys Student Poster Award der AO auf dem ECM: XII (2011): Implant Infection: mit dem Titel: A new animal model for implant-associated infected nonunions of the tibia and bacteria detection with fluorescence *in situ* hybridization

14 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

15 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. R. Schnettler, Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen, für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Alt danke ich für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gewährte Unterstützung. Sein großes Interesse und persönliches Engagement waren für mich Hilfe und Motivation gleichermaßen.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Domann, stellvertretender Direktor des Instituts für medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen, und seinen Mitarbeitern ohne deren mikrobiologisches Fachwissen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei Herrn Prof. Dr. Augat, Leiter des Instituts für Biomechanik der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau, sowie seinen Mitarbeitern Herrn Dr. Nabil Abdulazim und Herrn Dipl.-Ing. Penzkofer möchte ich mich für die Anfertigung der Micro-CT Bilder und die biomechanische Testung bedanken.

Zu sehr großem Dank fühle ich mich Frau Dr. Sommer aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen, für die eindrucksvollen rasterelektronenmikroskopischen Bilder verpflichtet.

Dank gebührt der Firma Medtronic für die Überlassung von rh-BMP-2.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**